

Einfluss Diabetes-assoziiierter Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF4 α

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität-Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Jörn Lausen

aus Gelting

Februar 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Ryffel
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Hensel
3. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 16 Mai 2001

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

Lausen,J., Thomas,H., Lemm,I., Bulman,M., Borgschulze,M., Lingott,A., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4 α gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. Nucleic Acids Res. 28, 430-43.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen I

I. Einleitung 1

1. Kernrezeptoren und Krankheiten des Menschen 1
2. Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α 3
3. Maturity onset diabetes of the young (MODY) 7
4. Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen 9
5. Zielsetzung der Arbeit 11

II. Material und Methoden 12

1. Chemikalien, Puffer und Enzyme 12
2. Molekularbiologische Standardmethoden und Vektoren 12
3. Zelllinien 15
4. Zellkultur von HeLa-, HEK293- und INS-1-Zellen 15
5. Transfektion 16
6. Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten Zellen 17
7. Herstellung stabiler induzierbarer Klone 17
8. Induzieren von stabilen Klonen und Bestimmen der Zellzahl 18
9. β -Galaktosidase-Färbung 18
10. Indirekte Immunfluoreszenz 18
11. Luciferaseassay 19
12. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen 19

13. Immunoblotanalyse	20
14. Gelretardationsanalyse	20
III. Ergebnisse	22
1. Eine Mutation in der DNA-Bindedomäne von HNF4α verändert die Aktivität des Transkriptionsfaktors auf einigen Promotoren	22
2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindestelle im HNF1α-Promotor	24
2.1. Die MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle des HNF1 α -Promotors verringert die Transaktivierung durch HNF4 α	24
2.2. Der Funktionsverlust des Promotors lässt sich auf den Verlust der HNF4 α -Bindung durch die MODY3-assoziierte Mutation zurückführen	26
3. Die MODY1-Mutationen beeinflussen die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors	28
3.1. Das Transaktivierungspotential der MODY1-Mutanten	28
3.2. Die untersuchten MODY1-Mutanten sind nicht dominant-negativ	30
3.3. Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten zeigen eine verringerte DNA-Bindung	32
3.4. Subzelluläre Lokalisation der Mutanten	34
4. HNF4α hemmt die Vermehrung von Zellen	35
4.1. Die Überexpression von HNF4 α hemmt das Aufwachsen stabiler Klone in INS-1-Zellen	35
4.2. Einige MODY1-assoziierte Mutanten reprimieren das Aufwachsen von Zellen nicht wie der Wildtyp	36
4.3. Herstellung stabiler induzierbarer Klone	38
4.4. HNF4 α ist in stabilen INS-1-Klonen induzierbar	39
4.5. Induzierte HNF4 α -INS-1-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung	42
4.6. HNF4 α ist in stabilen HEK293-Klonen induzierbar	45
4.7. Induzierte HNF4 α -HEK293-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung	47

IV. Diskussion	49
1. Die D69A-Mutante ist auf einigen Promotoren aktiver als der Wildtyp	49
2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindestelle im HNF1α-Promotor	50
3. Die MODY1-Mutationen bewirken einen Funktionsverlust des HNF4α-Proteins	51
4. HNF4α hemmt das Aufwachsen von INS-1-Zellen	55
5. HNF4α hemmt die Vermehrung von HEK293-Zellen	57
6. HNF4α und Erkrankungen des Menschen	58
V. Zusammenfassung	61
Literatur	63

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
CDTA	Diaminocyclohexantetraacetic acid
c.p.m	counts per minute
dCTP	desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,3-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	foetal calf serum
G418	geneticin sulphate
GRBB	gel retardation bindung buffer
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	hepatocyte nuclear factor
kDa	Kilodalton
PBS	phospat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	units

I. Einleitung

1. Kernrezeptoren und Krankheiten des Menschen

Die Kernrezeptoren stellen die größte Klasse der Transkriptionsfaktoren, zu ihnen gehören ligandenabhängige Rezeptoren, aber auch sogenannte Orphan-Rezeptoren, für die noch kein Ligand identifiziert worden ist oder für die keiner existiert (Mangelsdorf et al., 1995; Burris, 2001). Als Transkriptionsfaktoren spielen sie für die differentielle Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung von Organismen eine maßgebliche Rolle. Im adulten Organismus sorgen sie für den Erhalt des differenzierten Zustands von Zellen und vermitteln Anpassungen der Genexpression als Antwort auf extrazelluläre Signale wie Hormone oder intrazelluläre Signale wie Stoffwechselprodukte. Allen Mitgliedern der Kernrezeptor Superfamilie liegt eine in Domänen gegliederte Struktur zu Grunde (Kumar and Thompson, 1999; Laudet et al., 1992): N-terminal liegt die A/B-Domäne (siehe Abb. 1, Seite 9), die in manchen Rezeptoren eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF1) trägt. Dann folgt die C-Domäne, die am stärksten zwischen den verschiedenen Rezeptoren konserviert ist und zwei Zinkfinger motive beinhaltet. Im ersten Zinkfinger motiv liegt die sogenannte P-Box, die für die Spezifität der DNA-Bindung wichtig ist. Die folgende D-Domäne hat modulierende Funktion bei der DNA-Bindung, ist jedoch wenig konserviert. Für die Ligandenbindung ist die E-Domäne zuständig, sie trägt die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF2). Dieser Domäne werden Eigenschaften wie Transaktivierung, Dimerisierung und Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle zugeschrieben. Einige Rezeptoren besitzen C-terminal eine weitere Domäne, die F-Domäne.

Die Kernrezeptoren beeinflussen die Expression von Zielgenen durch das Binden spezifischer Bindestellen in Promotoren oder Enhancern. Sie sind in der Lage durch Rekrutierung von Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, die Genexpression auf der Ebene der Transkription zu aktivieren oder zu reprimieren (Torchia et al., 1998; Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999). Die Bindestellen für Kernrezeptoren bestehen klassischerweise aus zwei Halbseiten, die entweder als invertierte Wiederholung (IR; inverted repeat) oder direkte Wiederholung (DR; direct repeat) angeordnet sind, zwischen den Halbseiten liegt ein Spacer von unterschiedlicher Länge (Mangelsdorf and Evans, 1995). An ihre Bindestellen binden die meisten Rezeptoren entweder als Homodimer, wie zum Beispiel der Progesteronrezeptor oder als Heterodimer, wie zum Beispiel der Thyroidhormonrezeptor und der Retinsäurerezeptor.

Nach einem Modell der Funktion von Kernrezeptoren (Jiang et al., 1995) können vier Klassen von Kernrezeptoren unterschieden werden. Die Klasse-I-Rezeptoren wie der Steroidrezeptor liegen meist als Monomere in inaktiver Form an Hitzeschockproteine (HSP) gebunden im Cytoplasma vor. Wenn sie mit Liganden beladen werden, dissoziieren sie von den HSP ab und translozieren in den Kern. Dort binden sie an die als HRE's (hormon response element) bezeichneten Bindestellen in Promotoren oder Enhancern ihrer Zielgene.

Klasse-II-Kernrezeptoren, zum Beispiel der Retinoid-X-Rezeptor, liegen bereits als Dimer im Kern vor, werden jedoch erst aktiv, wenn sie mit ihrem Liganden interagieren. Klasse-III-Kernrezeptoren wie der „Steroidogenic-Factor-1“ binden DNA als Monomer. Die Klasse-IV der Kernrezeptoren wird von den Mitgliedern der HNF4-Genfamilie (hepatocyte nuclear factor 4) gebildet, zu der HNF4 α , HNF4 β und HNF4 γ gehören, auf die Besonderheiten dieser Klasse wird noch eingegangen.

Die wichtige Funktion von Kernrezeptoren wird in einer Reihe von vererbbaaren Krankheiten des Menschen deutlich, die auf Mutationen in Kernrezeptoren zurückgehen. Liegen diese Mutationen im kodierenden Bereich des Gens, können sie die Funktion des betreffenden Proteins durch Änderungen in der Aminosäuresequenz modifizieren. Davon können unterschiedliche Eigenschaften des Proteins betroffen sein. Mutationen in der Ligandenbindedomäne können die Affinität des Kernrezeptors zu seinem Liganden vermindern und dadurch die Aktivierung des Kernrezeptors verringern. Mutationen in der Ligandenbindedomäne des Thyroidhormonrezeptors beta vermindern zum Beispiel die Bindung seines Liganden an den Rezeptor und führen so zur Ausprägung von Thyroidhormonresistenz (RTH) (Dressel and Baniahmad, 2001). Bei Patienten mit RTH kommt es unter anderem zu Hördefekten, Lernschwierigkeiten, Sprachschwierigkeiten und intellektuellen Behinderungen.

Demgegenüber liegen viele der bekannten Mutationen im Vitamin-D-Rezeptor (VDR) in der DNA-Bindedomäne des Rezeptors und beeinträchtigen die DNA-Bindung (Malloy et al., 1999). Patienten mit Mutationen im VDR-Gen leiden aufgrund von Vitamin-D Resistenz unter vererbbarer Rachitis (HVDRR: hereditary vitamin-D resistant rickets).

Die entscheidende Funktion von Aktivatoren und Repressoren bei der Genaktivierung durch Kernrezeptoren wird bei der akuten promyeloischen Leukämie deutlich (Love et al., 2000). Hierbei kann es durch eine chromosomale Translokation zu einer Fusion des Gens für den Retinsäurerezeptors (RAR) mit anderen Transkriptionsfaktoren kommen, zum Beispiel dem PML-Gen (promyelocytic leukemia protein). Dadurch entsteht ein Fusionsprotein, das wie der Wildtyp dimerisiert, an die Bindestellen für den Retinsäurerezeptor bindet und ohne Liganden

durch Repressoren inaktiviert ist. Diese Repressoren können jetzt jedoch nicht mehr bei physiologischen Konzentrationen von Liganden ihren Platz für Aktivatoren freimachen (Chung and Cooney, 2001).

Als Beispiel für die vielfältigen Funktionen, die ein einziger Kernrezeptor in Entwicklung und Krankheit ausfüllt, kann besonders der PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma) genannt werden. PPAR γ ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Adipocyten (Rosen et al., 2000). Mutationen in PPAR γ sind unter anderem ursächlich für Stoffwechselkrankheiten (Barroso et al., 1999) und werden mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Sarraf et al., 1999).

Besonders interessant ist die vor Beginn dieser Arbeit entdeckte Rolle von Mutationen im Kernrezeptor HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) bei einer Form des nicht Insulin abhängigen Typ-II Diabetes (NIDDM: non insulin dependent diabetes mellitus). Hier wurde zum ersten mal gezeigt, dass Kernrezeptoren bei dieser häufigen Form des Diabetes eine Rolle spielen können (Yamagata et al., 1996).

2. Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α

HNF4 α (NR2A1) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999, 1999) bildet mit *Xenopus*-HNF4 β (Holewa et al., 1997) und dem HNF4 γ , das in Mensch und Maus gefunden wurde (Drewes et al., 1996; Plengvidhya et al., 1999) eine eigene Unterklasse innerhalb der Kernrezeptoren. Die Mitglieder dieser Genfamilie sind in ihrer Sequenz stark homolog, die Funktion von HNF4 β und HNF4 γ sind im Vergleich zum HNF4 α jedoch wenig untersucht. Auf eine frühe evolutionäre Funktion von HNF4 deutet die weite Verbreitung im Tierreich hin. So sind HNF4-Gene ausser in Säugern und *Xenopus*, in Fischen (McNair et al., 2000) und in Insekten (Swevers and Iatrou, 1998; Kapitskaya et al., 1998) gefunden worden.

Im Unterschied zu anderen Kernrezeptoren liegt HNF4 α bereits in Lösung als Homodimer im Kern vor, es bindet an Sequenzen, die als DR1-Elemente angeordnet sind (Jiang et al., 1995). Obwohl viele Mitglieder der Kernrezeptor-Familie durch Liganden aktiviert werden, ist das Vorhandensein eines Liganden für HNF4 α umstritten. Die Aktivität von HNF4 α scheint durch Acyl-CoenzymA-Thioestern (Acyl-CoA-Thioester) moduliert zu werden (Hertz et al., 1998), die geringe Wirkung und Spezifität der Acyl-CoA-Thioester sowie neuere Strukturuntersuchungen sprechen jedoch gegen Acyl-CoA-Thioester als klassischen Liganden

von HNF4 α (Peiler et al., 2000; Bogan et al., 2000). Daher muß HNF4 α weiterhin zur der grossen Gruppe der Kernrezeptoren ohne bekannten Liganden gezählt werden, den sogenannten Orphan-Rezeptoren.

HNF4 α weist den typischen Aufbau eines Kernrezeptors auf (Abb. 1, S. 9). Es besitzt eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF1) in der A/B-Domäne (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997) und in der C-Domäne zwei Zinkfinger motive zur DNA-Bindung. Die sogenannte P-Box im ersten Zinkfinger hat bei HNF4 eine typische Aminosäuresequenz, sie unterscheidet sich von allen anderen Kernrezeptoren und gilt daher als charakteristisches Merkmal der HNF4-Genfamilie (Sladek et al., 1990). An die folgende D-Domäne schliesst sich die Ligandenbindungsdomäne an, diese E-Domäne ist bei Kernrezeptoren für die Ligandenbindung und Dimerisierung verantwortlich. Im Unterschied zu den meisten anderen Kernrezeptoren besitzt HNF4 eine relativ grosse F-Domäne, die modulierend auf die Transaktivierung wirkt (Suaud et al., 1999a).

Aus der Exon/Intron-Struktur von HNF4 α lassen sich neun mögliche Spleißvarianten von HNF4 α ableiten (HNF4 α 1-HNF4 α 9), von denen fünf nachgewiesen sind (Sladek and Seidel, 2001). Es scheint zellspezifische Unterschiede in der Expression der Varianten zu geben, was auf eine Funktion der verschiedenen Varianten hindeutet (Nakhei et al., 1998).

In Vertebraten ist HNF4 α als gewebespezifischer Transkriptionsfaktor in der Leber, der Niere, im Magen-Darmtrakt und im endokrinen Pankreas exprimiert (Sladek et al., 1990; Miquerol et al., 1994). Die wichtige Funktion von HNF4 α in der Embryogenese von Vertebraten wird durch die spezifische Inaktivierung des HNF4 α -Gens der Maus deutlich. Diese Mäuse sterben noch vor Vollendung der Gastrulation durch eine Fehlentwicklung des visceralen Endoderms (Chen et al., 1994). Wenn das viscerele Endoderm aus Wildtyp-Gewebe besteht, können die HNF4 α -defizienten Tiere die Gastrulation beenden (Duncan et al., 1997). Bei diesen Tieren zeigt sich, dass HNF4 α für die Differenzierung zu voll funktionsfähigen Leberzellen benötigt wird, die frühe Entwicklung wie die Spezifikation der Leber ist jedoch nicht beeinflusst (Li et al., 2000). Für weitere Gewebe in denen HNF4 α exprimiert wird, stehen zur Zeit noch keine Daten aus HNF4 α -defizienten Embryonen zur Verfügung. Ausserdem gibt es keine adulten HNF4 α -defiziente Tiere, da die Embryonen vor der Geburt absterben.

Ein weiterer Hinweis auf eine frühe Rolle von HNF4 α in der Embryogenese zeigt sich darin, dass es in undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus vorhanden ist (Nakhei et al.,

1998) und im *Xenopus*-Ei als maternaler Faktor vorliegt (Holewa et al., 1996). Im *Xenopus*-Ei ist HNF4 α jedoch zunächst durch einen spezifischen Inhibitor inaktiviert (Peiler et al., 2000). Eine große Anzahl von Genen besitzt funktionelle Bindestellen für HNF4, diese Gene kodieren in der Mehrzahl für Proteine, die eine Rolle im Fett-, Aminosäure- oder Glucosestoffwechsel besitzen (Sladek and Seidel, 2001). Die Rolle von HNF4 α bei der Kontrolle der Genexpression ist sowohl durch Zellkultur-Experimente, als auch durch die Analyse HNF4 α -defizienter Mäuse gut belegt. So ist in der Leber von HNF4 α -defizienten Embryonen die Expression einer Reihe von Genen herunterreguliert. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren Pregnan-X-Rezeptor und HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 alpha) sowie Gene, die zum leberspezifischen Expressionsmuster gehören, wie Apolipoproteine, Aldolase-B, Phenylalanin-Hydroxylase, Transferrin und Erythropoietin (Li et al., 2000).

In Zellkultur ist gezeigt worden, dass HNF4 α die leberspezifische Genexpression aufrechterhält. So korreliert die leberspezifische Genexpression in Hepatomazellen mit der Expression von HNF4 α (Bulla, 1997; Spaeth and Weiss, 1997). Verstärkte Expression von HNF4 α aktiviert zahlreiche Gene, der Grad der Aktivierung ist dabei jedoch vom Zelltyp abhängig (Bailly et al., 1998).

Diese Experimente zeigen auch, dass HNF4 α eine zentrale Rolle in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HNF1 α besitzt (Kuo et al., 1992). HNF1 α ist ein Transkriptionsfaktor der POU/Homöobox-Familie, der ebenfalls eine wichtige Rolle in der Kontrolle der leberspezifischen Genexpression ausübt (Cereghini, 1996; Tronche et al., 1997). Der HNF1 α -Promotor enthält eine Bindestelle über die HNF4 α die Transkription des HNF1 α -Gens aktiviert (Tronche and Yaniv, 1992). Während die HNF1 α -Expression in HNF4 α -defizienten Mäusen verringert ist, kann eine Überexpression von HNF4 α in *Xenopus*-Eiern die ektopische Expression von HNF1 α in den Larven auslösen (Nastos et al., 1998).

Inzwischen ist das genregulatorische Potential der Aktivierung von HNF1 α durch HNF4 α auch in pankreatischen β -Zellen nachgewiesen worden. In der β -Zelllinie INS-1 ist durch spezifische Inaktivierung des endogenen HNF4 durch ein dominant-negatives Derivat von HNF4 α sowohl das HNF1 α -Gen, als auch eine Anzahl von HNF1 α -Zielgenen herunterreguliert (Wang et al., 2000a). Zusätzlich zur Regulation von HNF1 α durch HNF4 α kann auch das Vorhandensein eines autoregulatorischen Mechanismus angenommen werden, bei dem HNF1 α die HNF4 α -Expression über eine Bindestelle im HNF4 α -Promotor stimuliert und dadurch seine eigene Expression fördert (Zhong et al., 1994).

Ausserdem weiß man, dass HNF4 α in einer Kaskade von Transkriptionsfaktoren unterhalb der Transkriptionsfaktoren HNF3 β und GATA6 angeordnet ist (Morrissey et al., 1998; Duncan et al., 1998). Die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen HNF4 α und verschiedenen Transkriptionsfaktoren legen HNF4 α ins Zentrum eines Netzwerks von Transkriptionsfaktoren, welches einen spezifischen Zelltyp definiert.

Während HNF4 α für die Differenzierung und den Erhalt des differenzierten Zustands von normalen Zellen eine wichtige Rolle spielt, scheint HNF4 α in Tumoren der Niere herunterreguliert zu sein (Sel et al., 1996). Dies deutet auf eine Rolle von HNF4 α in der Tumorentstehung hin. Ob ein Verlust von HNF4 α die Ursache des dedifferenzierten Zustands der Tumorzellen oder nur Ausdruck desselben ist, ist bisher ungeklärt. Eine zu Beginn dieser Arbeit gefundene Mutation im HNF4 α -Gen der Hepatomazelllinie HepG2 (Michael Borgschulze, Institut für Zellbiologie) unterstützt die Annahme, dass Mutationen im HNF4 α -Gen mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung stehen. Diese Mutation in HepG2-Zellen führt zu einer Aminosäureänderung in der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors (siehe auch Abb. 1, Seite 9).

HNF4 α ist für die Expression einer grossen Anzahl von Genen wichtig und essentiell für die Embryonalentwicklung von Vertebraten, daher liegt es nahe, dass HNF4 α zu Erkrankungen des Menschen beiträgt. So werden Mutationen in der HNF4 α -Bindestelle von Blutgerinnungsfaktoren für die Entstehung von Hämophilie verantwortlich gemacht (Reijnen et al., 1992; Carew et al., 2000).

Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde publiziert, dass Mutationen im HNF4 α -Gen zu einer erblichen Form des Typ-II Diabetes mellitus führen, dem MODY1 („maturity onset diabetes of the young 1“).

3. Maturity onset diabetes of the young (MODY)

Maturity onset diabetes of the young (MODY) ist eine autosomal dominant vererbte, monogene Form des nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM; non insulin dependent diabetes mellitus). Charakteristisch für MODY ist das frühe Ausbrechen der Krankheit, meist vor dem 25. Lebensjahr. Man nimmt an, dass die Hauptursache der Krankheit in einer Störung der β -Zellen des Pankreas liegt. Diese Störung zeigt sich in einer unzureichenden Insulinsekretion bei erhöhtem Glucosespiegel im Blut. Als klinische Definition für MODY gilt das Auftreten des Diabetes in mindestens zwei Generationen und zumindest einem Betroffenen unter dem 25. Lebensjahr (Zusammengefasst in: Hattersley, 1998; Froguel and Velho, 1999; Winter and Silverstein, 2000).

Bisher sind fünf Gene identifiziert worden, in denen heterozygote Mutationen zu MODY führen. Bei MODY1 ist das HNF4 α -Gen betroffen, weitere MODY-Gene sind die Glucokinase (GCK; MODY2), HNF1 α (hepatocyte nuclear factor 1 alpha; MODY3), IPF1 (insulin promoter factor 1; MODY4) und HNF1 β (hepatocyte nuclear factor 1 beta; MODY5). Der molekulare Mechanismus, über den Mutationen in den betroffenen Genen zur Ausprägung der Krankheit führen, ist bisher nur für die Glucokinase (MODY2) bekannt. Die Glucokinase gehört zur Enzymgruppe der Hexokinasen, welche die Phosphorylierung von Glucose im Anfang der Glycolyse vermitteln. Als gewebespezifisches Enzym ist seine Expression auf die Leber und die β -Zellen des Pankreas beschränkt. Die Aktivität der Glucokinase bestimmt die Rate des Glucosemetabolismus in der Leber und in den β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. Die Insulinsekretion der β -Zellen wiederum ist vom Glucosemetabolismus abhängig, die Glucokinase wirkt somit als eine Art Sensor für die Glucosekonzentration. Diese Kopplung des Glucosemetabolismus der β -Zellen mit der Insulinsekretion ist durch die MODY-assoziierten Mutationen der Glucokinase gestört, infolgedessen kommt es zu einer unzureichenden Insulinsekretion.

Alle anderen Mutationen, die mit MODY in Verbindung gebracht werden, betreffen Transkriptionsfaktoren. Die Mechanismen, die hier zur Ausprägung der Krankheit führen, sind weitgehend unverstanden. Es gibt jedoch einige Hinweise aufgrund der Funktion dieser Faktoren als Regulatoren der Transkription.

Das IPF1-Gen (insulin promoter factor 1) gilt sowohl als ein Hauptregulator der Expression des Insulin-Gens als auch der Entwicklung des Pankreas (Stoffers et al., 1997a; Yamaoka and

Itakura, 1999). Heterozygote Mutationen im IPF-Gen führen zu MODY4 (Stoffers et al., 1997b), der homozygote Verlust der Genfunktion verhindert die Entwicklung des Pankreas (Stoffers et al., 1997c). Ob sich Mutationen im IPF1-Gen direkt auf das Insulin-Gen auswirken oder ob eine Störung in der Entwicklung der β -Zellen MODY4 verursacht, ist ungeklärt.

MODY3 ist mit etwa 65% die häufigste MODY-Form. Das betroffene Gen ist HNF1 α , es wird ähnlich wie HNF4 α in der Leber, der Niere, im Magen-Darmtrakt und im Pankreas exprimiert. Als Transkriptionsfaktor der POU-Homöoboxfamilie ist es für die transkriptionelle Kontrolle von Genen verantwortlich, die unter anderem für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase wichtig sind. Die Funktion von HNF1 α im Pankreas ist noch weitgehend unklar. In Zellkultur konnte durch spezifische Inhibierung von HNF1 α durch ein dominant-negatives Derivat jedoch gezeigt werden, dass HNF1 α in β -Zellen eine grosse Anzahl von Genen reguliert, die für den Glucosestoffwechsel wichtig sind. In diesen Zellen war zudem die Insulinsekretion gestört (Wang et al., 1998; Wang et al., 2000b). Transaktivierungsstudien zeigen zudem, dass das Insulin-Gen von HNF1 α aktiviert werden kann (Emens et al., 1992; Okita et al., 1999). Ob diese Regulation in MODY3-Patienten bedeutsam ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen.

Interessanterweise ist das HNF1 β -Gen, welches mit dem HNF1 α Heterodimere bilden kann auch ein MODY-Gen. HNF1 β ist strukturell und funktionell mit HNF1 α verwandt. Es bindet entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit HNF1 α an die gleichen Bindestellen von Promotoren wie HNF1 α . Möglicherweise ist die Ursache für die Entstehung von MODY bei HNF1 α und HNF1 β identisch. Inaktivierung in Mäusen führt bei HNF1 α unter anderem zur Entwicklung von Diabetes (Lee et al., 1998), bei HNF1 β jedoch zum embryonalen Tod (Barbacci et al., 1999). Ein Ausfall des einen Gens kann offensichtlich nicht durch das andere kompensiert werden. Ausserdem verursachen Mutationen im HNF1 β -Gen, im Gegensatz zum HNF1 α , zusätzlich zum Diabetes auch Nierendefekte (Bingham et al., 2000; Wild et al., 2000). Die beiden Gene sind funktionell also nicht redundant.

4. Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen

Heterozygote Mutationen im HNF4 α -Gen sind ursächlich für MODY1 (Yamagata et al., 1996). In Abbildung 1 sind die Positionen von MODY1-assoziierten Mutationen eingetragen, die zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren. Zusätzlich ist die bereits erwähnte Mutation D69A aus der Hepatomazelllinie HepG2 eingetragen.

Die MODY1-assoziierten Mutationen R154X (Lindner et al., 1997) und Q268X (Yamagata et al., 1996) sind sogenannte nonsense-Mutationen, die durch Einführung eines Stopcodons zu einem vorzeitigen Ende der Proteinsynthese führen. Die Proteine sind dadurch C-terminal verkürzt. Die missense-Mutationen R127W (Furuta et al., 1997; Bulman et al., 2000), V255M (Möller et al., 1997) und E276Q (Bulman et al., 1997) führen zur Änderung einer einzelnen Aminosäure.

Die D69A-Mutation wurde in HepG2-Zellen gefunden, sie betrifft die P-Box im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne von HNF4 α . Möglicherweise ist sie eine tumorassoziierte Mutation, die zur Tumorentstehung beigetragen haben könnte.

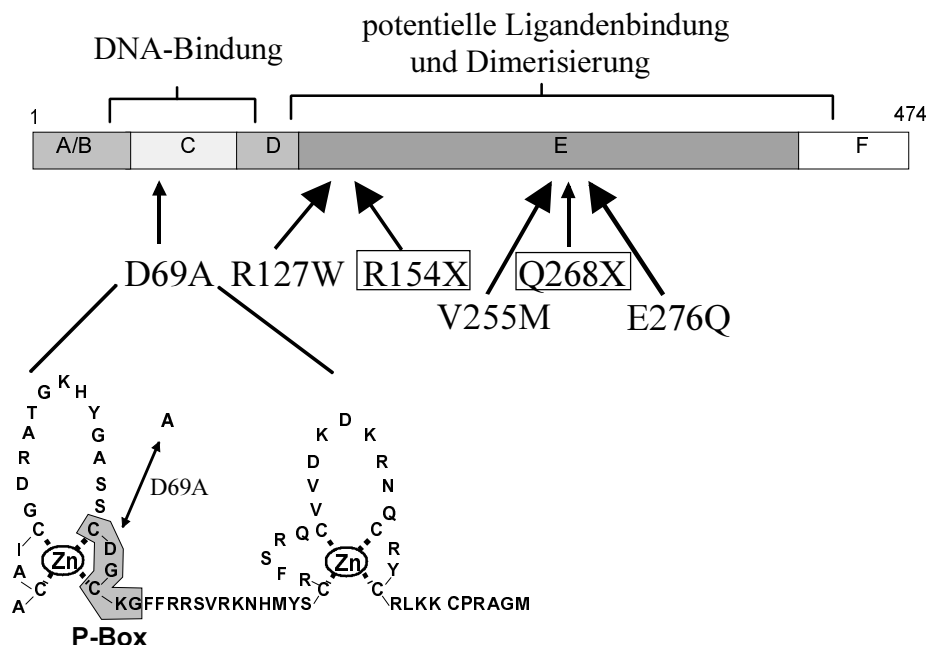


Abbildung 1: Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen. Die Domänenstruktur des HNF4 α -Proteins und die Lage der Mutationen sind gezeigt. Die D69A-Mutation wurde in der Hepatomazelllinie HepG2 gefunden und betrifft die P-Box im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne. Die missense-Mutationen R127W, V255M und E276Q sind MODY1 assoziiert. Die Mutationen R154X und Q268X sind MODY1-assoziierte nonsense-Mutationen, die zu einem verkürzten Protein führen.

Ob die MODY1-assoziierten Mutationen wirklich ursächlich für die Krankheit sind oder nur Polymorphismen, die mit dem wirklich für die Erkrankung wichtigen Gen koseggregieren, war zu Beginn dieser Arbeit für die einzelnen Mutationen in unterschiedlichem Masse klar. Zum Beispiel war die Q268X-Mutation wegen des statistisch gut abgesicherten Stammbaums der betroffenen Familie mit grosser Sicherheit Ursache für MODY1. Dahingegen war die V255M-Mutante ein unsicherer MODY1-Kandidat. Da die statistische Absicherung nicht gut war (Möller et al., 1997) und die Mutation eines Valins (V) zu einem Methionin (M) eine eher konservative Veränderung darstellt.

Alle MODY1-Mutationen führen entweder zu einem verkürzten Protein mit verkürzter E-Domäne oder liegen in Bereichen, die für die Transaktivierung wichtig sein könnten. Daher bestand die Möglichkeit, dass diese Mutationen die Transaktivierungsfähigkeit des HNF4 α -Proteins beeinträchtigen. Wenn das mutierte Protein defizient in der Transaktivierung ist, aber seine Fähigkeit beibehält mit dem Wildtyp Dimere zu bilden, könnte sich ausserdem ein dominant-negativer Effekt auf das Wildtyp-Protein einstellen.

Auf die wichtige Funktion von HNF4 α für die Regulation der Expression des HNF1 α -Gens ist bereits eingegangen worden. Bei einem Funktionsverlust von HNF4 α kann daher vermutet werden, dass sich dies mittelbar durch die Fehlregulation des HNF1 α -Gens auf die Expression des Insulin-Gens auswirkt. Diese Möglichkeit wird durch die Tatsache unterstützt, dass eine MODY3-assoziierte Mutation in der potentiellen Bindestelle für HNF4 im Promotorbereich des HNF1 α -Gen des Menschen liegt (Gagnoli et al., 1997).

Da MODY-Patienten nicht schon bei der Geburt erkrankt sind, ist eine Fehlregulation des Insulin-Gens als alleinige Ursache für MODY1 jedoch eher unwahrscheinlich, denn dann sollte sich die Krankheit sofort ausprägen. Es ist daher anzunehmen, dass bei MODY1 die Bedeutung eines Faktors mit der Zeit zunimmt bis es zur Ausprägung des Phänotyps kommt. Ein solcher Faktor könnte die Störung der Neogenese der β -Zellen des Pankreas sein.

5. Zielsetzung der Arbeit

In der Hepatomazelllinie HepG2 ist das HNF4 α -Gen mutiert, diese Mutation könnte zur Tumorentstehung beigetragen haben. Um eine Beteiligung an der Tumorentstehung abschätzen zu können, sollte in dieser Arbeit die Auswirkung der Mutation auf die Eigenschaften von HNF4 α ermittelt werden.

Die Expression des HNF1 α -Gens (MODY3) ist eng mit der Expression des HNF4 α -Gens (MODY1) verknüpft. Daher liegt es nahe zu vermuten, dass Mutationen in diesen Transkriptionsfaktoren über einen gemeinsamen Mechanismus zur Erkrankung führen.

Ein Hinweis auf einen gemeinsamen Mechanismus ist eine MODY3-Mutation in einer putativen Bindestelle für HNF4 im Promotor des HNF1 α -Gens des Menschen. Die Auswirkung dieser Mutation auf die Aktivierbarkeit des HNF1 α -Promotors durch HNF4 α sollte untersucht werden.

Mutationen im zellspezifischen Transkriptionsfaktor HNF4 α führen im Menschen zu MODY1. Um Hinweise auf die Wirkungsweise der Mutationen bei der Entstehung von MODY1 zu erhalten, sollten die Folgen der MODY1-Mutationen auf die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors untersucht werden.

MODY1 entwickelt sich mit der Zeit, die Mutationsträger sind bei der Geburt gesund. Ein Ziel dieser Arbeit war daher zu ermitteln, ob ein Einfluss von HNF4 α auf die Vermehrung von β -Zellen zu der Entwicklung von MODY1 beitragen könnte. Dazu sollte ein möglicher Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung untersucht werden und mit den MODY1-Mutanten verglichen werden. Dafür sollten stabile induzierbare Zellklone der β -Zelllinie INS-1 hergestellt werden.

Da ein Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung auch zur Entstehung von Nierentumoren beitragen könnte, sollte der Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung in stabilen induzierbaren HNF4 α -Zellklonen der embryonalen humanen Nierenzelllinie HEK293 ermittelt werden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien, Puffer und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neuulm), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

Falls nicht anders angegeben wurden die verwendeten Puffer und Lösungen nach den Angaben in Sambrook et. al. (1989) hergestellt.

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme stammten aus der Herstellung von Roche (Mannheim), Gibco BRL (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg).

2. Molekularbiologische Standardmethoden und Vektoren

Molekularbiologische Standardmethoden wie Anzucht von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Modifikation von DNA und Gelelektrophoresen wurden wenn nicht anders beschrieben nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion erfolgte mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen.

Expressionsvektoren:

pOPmycHNF4 α 2

Um den pOP-mycHNF4 α 2-Vektor zu konstruieren wurde zunächst der myc-tag aus dem pCS2+MT Vektor (Rupp et al., 1994) mit der PCR (polymerase chain reaktion) amplifiziert. Dazu wurden ein 5'-Primer mit der Sequenz (5'-ATAAGAATGCGGCCGC GCTATGGAGCAAAAGCTC-3') und ein 3'-Primer mit der Sequenz (5'-ATAAGAATG GCGGCCGCTCTAGAGGGGTACCAGGCCTTG-3') eingesetzt. Die Primer führten *NotI*-Schnittstellen (unterstrichen) ein, ausserdem wurde eine *KpnI*-Schnittstelle (fett) in den 3'-Primer eingeführt. Die *NotI*-Schnittstellen wurden genutzt, um das PCR-Fragment anstelle des *cat*-Genes in den pOP13-Expressionsvektor (Stratagene) zu klonieren. Die Sequenz des HNF4 α 2 des Menschen wurde aus dem RcHNF4 α 2 Expressionsvektor (Drewes et al., 1996) amplifiziert. Dabei wurden der 5' Primer (5'-GGGGTACCATGCGACTCTCCAAAACC-3')

mit einer *KpnI*-Schnittstelle (fett) und 3' ein SP6-Primer (5'-CTATTTAGGT GACACTATAG-3') eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschliessend als *KpnI-NotI*-Fragment im Leserahmen hinter den myc-tag kloniert. Die PCR Reaktionen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten HNF4 α 2-Mutationen wurden mit Hilfe des „QuickChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene in den pOPmycHNF4 α 2 Expressionsvektor eingeführt. Dabei wurden die vom Hersteller beschriebenen Bedingungen eingehalten, die für die Mutagenesereaktionen verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die entsprechenden Konstrukte wurden nach der Mutante benannt, die sie exprimieren zum Beispiel, pOPmycD69A.

Um mögliche Mutationen durch die Mutagenese in den Konstrukten zu vermeiden, wurden die Leserahmen sequenziert und in den leeren pOP13-Vektor zurück kloniert.

Tabelle 1: Zusammenstellung der Primerpaare für die Mutagenese.

Mutante	Mutageneseprimer
D69A	A: 5'-GAGCTGTGCCGGCTGCAAG-3' B: 5'-CTTGCAGCCGGCACAGCTC-3'
R154X	A: 5'-GTCCTGTCCTGACAGATCACC-3' B: 5'-GGTGATCTGTCAGGACAGGAC-5'
R127W	A: 5'-CGGGACTGGATCAGCACTCG-3' B: 5'-CGAGTGCTGATCCAGTCCCG-5'
V255M	A: 5'-GATGAGCCGGATGTCCATACG-3' B: 5'-CGTATGGACATCCGGCTCATC-3'
Q268X	A: 5'-CGATCTGCAGCTCCTAGAAGGG-3' B: 5'-CCCTTCTAGGAGCTGCAGATCG-3'
E276Q	A: 5'-GATGACAATCAGTATGCCTACC-3' B: 5'-GGTAGGCATACTGATTGTCATC-3'
hHNF1(-325/+138)mut	A: 5'-GCTGAAGTCCCAAGTTCAGTCCC-3' B: 5'-GGGACTGAACTTGGGACTTCAGC-3'

Rc/CMVmycHNF4 α 2

Die Leserahmen der oben aufgeführten pOP13-Konstrukte wurden für einen Teil der Versuche über *NotI*-Schnittstellen in den Rc/CMV-Vektor (Invitrogen) eingeführt. Dies gilt sowohl für den Wildtyp HNF4 α als auch die Mutanten.

Rc/CMV- β -gal

Der offene Leserahmen des LacZ-Gens wurde mittels *NotI*-Schnittstellen aus pCS- β (Clontech) in den Rc/CMV-Vektor kloniert.

Rc/CMVmycE360X

Die E360X-Mutation wurde durch PCR mit dem Rc/CMVmycHNF4 α 2 als Template hergestellt. Als 5'-Primer wurde ein T7-Primer und 3' ein Primer (E360X: 5'-TCTGCGGCCGCTAGTTGTCAATCTTGGCC-3') verwendet, der ein Stopcodon und eine *NotI*-Restriktionsstelle (unterstrichen) einführt. Mit Hilfe von *NotI*-Schnittstellen wurde das amplifizierte Fragment in einen leeren Rc/CMV-Vektor kloniert und anschliessend sequenziert.

p22LFE1

Der p22LFE1-Vektor ist von Angrand et al. 1998 beschrieben worden. Mit seiner Hilfe ist es möglich stabile induzierbare Klone herzustellen. Eine Beschreibung dieses Systems erfolgt auf Seite 38. Der p22LFE1-Vektor wurde genutzt um stabile Klone von INS-1- und HEK293-Zellen herzustellen, diese Klone exprimieren das LacZ-Gen induzierbar. Für die Herstellung stabiler HNF4 α -Klone wurde anstelle des LacZ-Gens der Leserahmen für HNF4 α beziehungsweise seine Mutanten einkloniert. Für diese Klonierung wurde ein modifizierter p22LFE1-Vektor eingesetzt bei dem das LacZ-Gen durch *NotI*-Schnittstellen ersetzt worden war (Heike Thomas, Institut für Zellbiologie, Essen). Mit Hilfe dieser *NotI*-Schnittstelle wurden die entsprechenden Leserahmen einkloniert.

Reportergene:

H4-tk-lucI

Der H4-tk-lucI Reporter besitzt vier HNF4-Bindestellen vor dem Thymidinkinase-Promotor und dem Luciferasegen (Drewes et al., 1994).

hHNF1(-325/+138)lucII

Der HNF1 α -Promotor wurde aus einem 6 kb grossen genomischen Fragment, das im Blueskript-SK+ kloniert war (Ira Lemm, Institut für Zellbiologie, Essen) (Lausen et al., 2000), mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde ein T3-Primer und ein Primer benutzt der am 5'-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle einführt. Das Promotorfragment wurde als *SacI-HindIII*-Fragment in einen auf dem pGL3-BasicII (Promega) basierenden Luciferase-Reportergen-Vektor (Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Essen) kloniert.

hHNF1(-325/+138)mut

Dieser Vektor entspricht dem hHNF1(-325/+138)lucII bei dem die putative HNF4-Bindestelle an Position (-58) mittels Mutagenese mutiert wurde. Das verwendete Primerpaar ist in Tabelle 1 angegeben.

xHNF1(-594/-207)lucI

Promotorsequenz aus dem *Xenopus*-HNF1 α (Weber et al., 1996).

rApo-AI(-1000/+14)lucI

Promotorsequenz aus dem Apolipoprotein-AI-Gen der Ratte (Hassan Nakhei, Institut für Zellbiologie, Essen) (Lausen et al., 2000).

3. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengefasst

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HeLa	Cervixkarzinomzelllinie des Menschen
HEK293	Immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen
INS-1	Insulinoma- β -Zelllinie der Ratte

4. Zellkultur von HeLa-, HEK293- und INS-1-Zellen

HeLa- und HEK293-Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre (95%) bei 37°C und 7,5% CO₂, in DMEM (Biochrom), mit 10% hitzeinaktivierten fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin sowie je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin gehalten. INS-1-Zellen (Asfari et al., 1992) wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, allerdings in RPMI 1640 mit einem Zusatz von 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM Hepes und 50 μ M Mercaptoethanol (Gibco). Die Zellen wurden unter konfluenten Bedingungen gehalten, für die Versuche zur Wachstumshemmung wurden die Zellen bis zur Passage 25 verwendet.

Zur Erhaltung der Zelllinien und stabilen Klone wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden 10⁷ Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM beziehungsweise RPMI 1640) aufgenommen, in 1 ml Aliquots langsam auf -70°C

abgekühlt und dann über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Aliquots auf 37°C erwärmt und in 10 ml vorgewärmtes Medium in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

5. Transfektion

HeLa- und HEK293-Zellen wurden wenn nicht anders beschrieben in 6-wells mit 2,3 µg Plasmid-DNA und 6 µl Lipofektamin (Gibco, BRL) nach Angaben des Herstellers transfiziert, die Transfektion von INS-1-Zellen erfolgte mit 10 µl Lipofektamin um eine höhere Effizienz zu erreichen.

Transfektionen von HEK293-Zellen für die Herstellung von Kernextrakten wurden nach der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Es wurden 3×10^6 Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. 20 Stunden nach Aussaat wurde das Medium gewechselt und drei Stunden später das Präzipitat auf die Zellen gegeben.

Ein Präzipitationsansatz für eine Zellkulturschale enthielt 20 µg DNA in 75 µl 1 mM EDTA-Lösung und 262,5 µl H₂O, 375 µl 2xHBS-Puffer sowie 37,5 µl 2,5 M CaCl₂. Dieser Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann über die Zellen verteilt. Es wurde 20 µl 50 mM Chloroquin zugegeben und dann vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 min mit 15% Glycerol in PBS inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Glycerol wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen danach Medium zugegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

2xHBS Puffer:

274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄, 1,1 mM Dextrose, 42 mM Hepes (pH 7,05)

6. Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten Zellen

Die Kernextrakte aus Calciumphosphat-transfizierten HEK293-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion hergestellt. Die Herstellung von Kernextrakten erfolgte auf Eis, mit vorgekühlten Medien und Zentrifugen (4°C), zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Gummischaber von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden dann durch 5 Minuten zentrifugieren bei 750 x g sedimentiert, das Pellet wurde in 0,5 ml Puffer A aufgenommen und 10 min. inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 250 µl Puffer A aufgenommen und in einem Handhomogenisator aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, in 50 µl Puffer C aufgenommen und bei häufigem Vortexen 30 min inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 50,000 U/min. (Beckmann TL-100) wurden gelöste Kernproteine und unlösliche Bestandteile getrennt. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Puffer A

10 mM Hepes (pH 7,6), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT

Puffer C

20 mM Hepes (pH 7,6), 25 % (v/v) Glycerol, 420 nM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT

7. Herstellung stabiler induzierbarer Klone

Die folgende Beschreibung bezieht sich sowohl auf die Herstellung stabiler INS-1- als auch auf die Herstellung stabiler HEK293-Klone. Zunächst wurden die Zellen mit Lipofektamin transfiziert, dazu wurden die beschriebenen LFE-Vektoren eingesetzt. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, in verschiedenen Verdünnungen von 1:1 bis 1:10 auf 10 cm Schalen verteilt und mit Puromycin (0,5 µg/ml) haltigem Medium auf stabile Klone selektiert. Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt, in eine 24-well-Schale überführt und später mittels Immunfluoreszenz und Immunoblotanalyse auf Induzierbarkeit überprüft.

8. Induzieren von stabilen Klonen und Bestimmen der Zellzahl

Die hergestellten stabilen induzierbaren INS-1- und HEK293-Klone wurden durch Zugabe von Tamoxifen (4-OH-Tamoxifen, 100 nM) ins Medium induziert.

Zur Bestimmung des Anteils der das Transgen exprimierender Zellen innerhalb eines Klones wurden 50,000 Zellen pro 6-well-Schale ausgesät und induziert. Jeden zweiten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt, dieses Medium enthielt kein Tamoxifen mehr. Am sechsten Tag wurden die Zellen trypsiniert und erneut 50,000 Zellen pro 6-well-Schale ausgesät. Am Tag 2, 6 und 12 wurde, mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Zählen unter dem Fluoreszenzmikroskop, der Anteil der exprimierenden Zellen bestimmt.

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 50,000 Zellen in 6-well-Schalen ausgesät und mit 100 nM Tamoxifen induziert. Nicht-induzierte Klone, die als Kontrollen dienten, wurden mit dem gleichen Volumen Ethanol (95%) behandelt. Alle zwei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Am sechsten Tag wurden die Zellen trypsiniert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

9. β -Galaktosidase-Färbung

Zum Nachweis der LacZ-Expression von Zellen wurden die Zellen zunächst in PBS mit 1% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd fixiert. Dann wurden die Zellen 4-8 Stunden in PBS mit 5 mM Kaliumferricyanide, 5 mM Kaliumferrocyanid, 2 mM $MgCl_2$ und 1mg/ml X-Gal. (5-bromo-4-chloro-3- β -D-galactopyranosid) inkubiert.

10. Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte in 3 cm Zellkulturschalen oder auf Glasplättchen. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Methanol oder Paraformaldehyd (4%) fixiert und einmal mit PBS/0,01% Tween-20 und danach zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit PBS/10% Ziegsenrum für 1 Stunde bei 4°C abgesättigt. Als Erstantikörper diente der monoklonale gegen den myc-tag gerichtete Antikörper 9E10 (Evan et al., 1985), er wurde in einer Verdünnung von 1:5 in DMEM auf die

Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei RT wurde die Antikörperverschüttung durch mehrmaliges waschen mit PBS entfernt und danach der Cy3-gekoppelte Zweitantikörper (Dianova) in einer Verschüttung von 1:200 in PBS/10% Ziegeneserum auf die Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für eine Stunde, bei 4°C und im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS und Trocknen der fixierten Zellen mit einem Zellfasertuch, wurden die Zellen mit „Mounting-Medium“ (Vectashield, Vector-Laboratories) eingedeckelt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) ausgewertet.

11. Luciferaseassay

Für den Luciferaseassay wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion in 50 µl Lysepuffer aufgenommen (25 mM Trisphosphat (ph 7,8), 2 mM DTT, 2 mM CDTA, 1% Triton-X-100), dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummispaltels von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert, von dem Überstand wurden 20 µl mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

12. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Zellextrakte wurden in derselben Weise hergestellt wie für den Luciferaseassay beschrieben, der dort verwendete Lysepuffer wurde jedoch zusätzlich mit SDS versetzt (0,1%). Die Zellen wurden durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen und Vortexen aufgebrochen. Nachdem das unlösliche Pellet abzentrifugiert worden war, wurde der Überstand bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mit dem „BioRAD Protein Assay System“ (Biorad).

13. Immunoblotanalyse

Die Immunoblotanalysen wurden mit dem myc-spezifischen monoklonalen Antikörper 9E10 durchgeführt, dieser erkennt spezifisch den myc-tag, den alle verwendeten Konstrukte als Fusion am N-Terminus tragen. Zum Nachweis der Proteine wurden die entsprechenden Extrakte einer denaturierenden Gelelektrophorese unterzogen (Sambrock et al., 1989). Danach wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell) geblottet. Die Membran wurde mit Blockingreagenz (Amersham, Braunschweig) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit einer 1:5 Verdünnung des 9E10 Antikörpers in PBS/0,05% Tween-20 inkubiert. Die Membran wurde eine halbe Stunde in PBS/0,05% Tween gewaschen dabei wurde die Waschlösung dreimal erneuert. Der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (Amersham) wurde in einer 1:5000 Verdünnung in PBS/0,05% Tween auf die Membran gegeben, nach einer Stunde Inkubation und erneutem waschen konnte der Zweitantikörper mittels des ECL-Systems (enhanced chemoluminescence system, Amersham) detektiert werden.

14. Gelretardationsanalyse

Für die Gelretardationsanalysen wurden Kernextrakte aus Zellkultur-Zellen und Kernextrakt aus Rattenleber (Fabian Esser, Institut für Zellbiologie, Essen) eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben enthielt jeder Reaktionsmix für die Gelretardationen 2 µg Gesamtprotein, 150 ng Lachssperma-DNA als unspezifischer Kompetitor, 10^4 c.p.m. ^{32}P markiertes Oligonukleotid und gegebenenfalls Antikörper. Der Reaktionsmix von 15 µl Volumen wurde zunächst ohne Oligonukleotid in GRBB⁻ (10 mM Hepes (pH 7,6), 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 4% Ficoll) angesetzt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert, dann wurde das Oligonukleotid in 5 µl GRBB⁻ zugegeben und erneut 15 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsmix wurde in einem Polyacrylamidgel (4%) in 0,25 x TBE für 1,5 Stunden bei 100 Volt aufgetrennt. Um die retardierten DNA/Protein-Komplexe sichtbar zu machen wurde das Gel getrocknet und für 12-48 Stunden mit einem Film belegt.

Oligonukleotide:H4-Oligonukleotid:

Das H4-Oligonukleotid beinhaltet die HNF4-Bindestelle aus dem *Xenopus*-HNF1 α -Promotor (Zapp et al., 1993).

5' -GATCCACTTTGTGGGGTCCAAAGTTCAGTAA-3
3' -GTGAAACACCCCAGGTTTCAAGTCATTGAAC-5'

hHNF1Prom-Oligonukleotid:

Das hHNF1Prom-Oligonukleotid beinhaltet die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 α -Promotor des Menschen.

5' -CGGCTGAAGTCCAAAGTTCAGTCCCTTCGT-3'
3' -TCGAGCCGACTTCAGGTTTCAAGTCAGGGAAGCAGATC-5'

hHNF1Prom.mut-Oligonukleotid:

Das hHNF1Prom.mut-Oligonukleotid beinhaltet die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 α -Promotor des Menschen. Es trägt jedoch eine Mutation in der Bindestelle wie sie bei MODY3 vorkommt. Die veränderte Base ist unterstrichen.

5' -CGGCTGAAGTCCCAAGTTCAGTCCCTTCGT-3'
3' -TCGAGCCGACTTCAGGGTTCAAGTCAGGGAAGCAGATC-5'

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase und α -³²P-dCTP radioaktiv markiert.

Antikörper:H4/55

Der H4/55 ist ein monoklonaler Antikörper der ein Epitop aus dem ABCD-Fragment des Ratten-HNF4 α erkennt (Holewa et al., 1996).

9E10

Der 9E10 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den myc-tag gerichtet ist (Evan et al., 1985).

III. Ergebnisse

1. Eine Mutation in der DNA-Bindedomäne von HNF4 α verändert die Aktivität des Transkriptionsfaktors auf einigen Promotoren

Im Rahmen einer Suche nach tumorassoziierten Mutationen im HNF4 α -Gen wurden von M. Borgschulze (Institut für Zellbiologie, Essen) verschiedene Tumorzelllinien untersucht. In der Hepatomazelllinie HepG2 fand er eine Mutation im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne von HNF4 α . Diese Mutation führt in der für alle Mitglieder der HNF4-Genfamilie typischen P-Box zu einem Austausch einer Asparaginsäure gegen ein Alanin an der Aminosäureposition 69 (D69A). Dieser Austausch einer sauren geladenen Aminosäure gegen eine aliphatische ungeladene Aminosäure in einem funktionell wichtigen Bereich von HNF4 α legt einen Einfluss auf die Funktion des Transkriptionsfaktors nahe. Daher wurde die Mutation in einen Expressionsvektor für HNF4 α eingeführt und seine Transaktivierungsfähigkeit auf verschiedenen Luciferasereportergenen in HeLa-Zellen getestet. HeLa-Zellen besitzen kein endogenes HNF4, das die Reportergene beeinflussen könnte und sind daher gut für diese Reportergenassays geeignet. Die Reportergene wurden zusammen mit einem für die D69A-Mutante kodierenden Expressionsvektor in HeLa-Zellen kotransfiziert. Anschliessend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt und mit der Aktivität bei Transfektion mit dem Wildtyp-HNF4 α verglichen.

Zunächst wurde eine Sättigungskurve auf dem künstlichen, HNF4-abhängigen Reportergen H4-tk-luc erstellt, dieses besitzt vier HNF4-Bindestellen vor dem Thymidinkinase-Promotor. Es wurden steigende Mengen Expressionsvektor mit einer gleichbleibenden Menge Reportergen in HeLa-Zellen transfiziert und am nächsten Tag ein Luciferasenachweis durchgeführt. In Abbildung 2A ist gezeigt, dass bei steigender Menge transfizierten Expressionsvektor für die D69A-Mutante (unterbrochene Linie) die Aktivität des H4-tk-luc Reportergens in gleichem Maße zunimmt wie bei Transfektion mit steigenden Mengen des HNF4 α -Wildtyp-Vektors. Um die Funktion der D69A-Mutante auch auf einem natürlichen Zielpromotor von HNF4 zu testen wurden verschiedene Promotoren mit HNF4-Bindestellen ausgesucht. Zuerst wurde eine Sättigungskurve auf dem humanen HNF1 α -Promotor hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen erstellt. Wie aus Abbildung 2B ersichtlich, zeigt die D69A-Mutante (unterbrochene Linie) auf dem hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen bei allen

untersuchten Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-HNF4 α (durchgehende Linie). Auf dem *Xenopus* HNF1 α -Promotor-Reportergen xHNF1(-594/-207)lucI transaktiviert die D69A-Mutante bei einer Konzentration von 60 ng Expressionsvektor 2-fach bis 3-fach stärker als der Wildtyp (Abbildung 2C). Auf dem Ratten Apolipoprotein-AI Promotor-Reportergen rApoAI(-1000/+14)lucI, kann bei Transfektion des Wildtyps keine Aktivierung des Promotors beobachtet werden. Transfektion mit der D69A-Mutante aktiviert das Reportergen jedoch 3-fach (Abbildung 2D). Die D69A-Mutante transaktiviert auf einigen Promotoren also vergleichbar mit dem Wildtyp, auf anderen Promotoren zeigt sie jedoch eine erhöhte Aktivität.

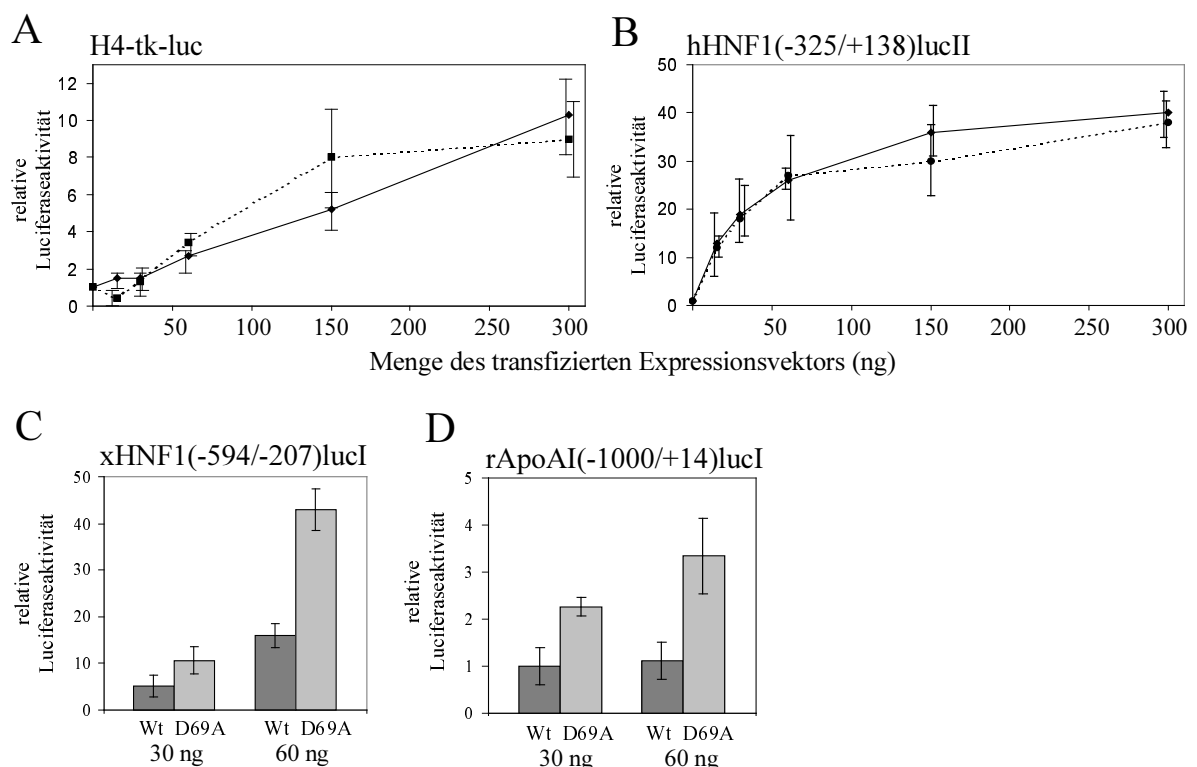


Abbildung 2: Transaktivierungspotential von HNF4 α -Wildtyp und der D69A-Mutante auf verschiedenen Promotoren. **(A und B)** Sättigungskurve des Transaktivierungspotentials des HNF4 α -Wildtyps (durchgehende Linie) und der D69A-Mutante (unterbrochene Linie) auf dem künstlichen HNF4-Reportergen H4-tk-luc (A) und dem humanen HNF1 α -Reportergen hHNF1(-325/+138)lucII (B). Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität bezogen auf den Wert nach Transfektion mit leerem Expressionsvektor pOP13, bei unterschiedlicher Konzentration von HNF4-Expressionsvektor pOPmycHNF4 α und D69A-Expressionsvektor pOPmycD69A. Es wurden jeweils 2 μ g Reportergen und Expressionsvektor in Mengen von 15, 30, 60, 150 und 300 ng in HeLa-Zellen kotransfiziert, die DNA-Menge wurde mit leerem pOP13-Vektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Werten an. **(C und D)** Transaktivierungspotential des Wildtyps (Wt) und der D69A-Mutante gemessen auf dem *Xenopus* HNF1 α -Reportergen xHNF1(-594/-207)lucI und dem Ratten Apolipoprotein-AI-Reportergen rApoAI(-1000/+14)lucI bei den angegebenen Mengen an transfiziertem Expressionsvektor. Transfiziert wurde jeweils mit 2 μ g Reportergen bei konstanter Menge Gesamt-DNA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Werten an.

2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindungsstelle im HNF1 α -Promotor

HNF4 α gilt als einer der wichtigsten Faktoren für die Expression des HNF1 α -Gens. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass eine Mutation in der putativen HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor MODY3 assoziiert ist. Es lag nahe, dass durch diese Mutation die Bindefähigkeit von HNF4 α an seine Bindestelle im HNF1 α -Promotor beeinflusst und dadurch die Expression des HNF1 α -Gens gestört wird. Dies würde für die Annahme sprechen, dass Mutationen im HNF4 α -Gen sich auf die Expression von HNF1 α auswirken und dadurch zum MODY1-Phänotyp beitragen.

2.1. Die MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle des HNF1 α -Promotors verringert die Transaktivierung durch HNF4 α

Um die Auswirkung der MODY3-assoziierten Mutation in der HNF4-Bindestelle des humanen HNF1 α -Promotors zu untersuchen, wurde die MODY3-Mutation in das Reportergen hHNF1(-325/+138)lucII eingeführt (Abbildung 3A). Für die Analyse des mutierten Promotors wurden jeweils 2 μ g des mutierten Reportergens mit verschiedenen Mengen Expressionsvektor für HNF4 α in HeLa-Zellen kotransfiziert und die Luciferaseaktivität mit dem Wildtyp verglichen. Dabei zeigte sich, dass der Luciferasewert nach Transfektion des mutierten HNF1 α -Promotors ohne Expressionsvektor um die Hälfte geringer war als der Wert des Wildtyp-Promotors (Daten nicht gezeigt). Da HeLa-Zellen kein HNF4 exprimieren, könnte diese Differenz von einem unbekannten Faktor verursacht werden, der ebenfalls über die HNF4-Bindestelle aktivieren kann.

Wie aus Abbildung 3B ersichtlich, läßt sich der mutierte HNF1 α -Promotor durch transfiziertes HNF4 α im Vergleich zum Wildtyp kaum noch aktivieren. Dieser Effekt zeigt sich bei allen untersuchten Konzentrationen des Expressionsvektors. Selbst bei einer Konzentration, die für den Wildtyp sättigend ist (300 ng), läßt sich der mutierte Promotor nur um das Vierfache gegenüber mit dem leeren Expressionsvektor transfizierten Zellen aktivieren, während sich der Wildtyp-Promotor bei sättigender Konzentration um das 35-fache aktivieren lässt.

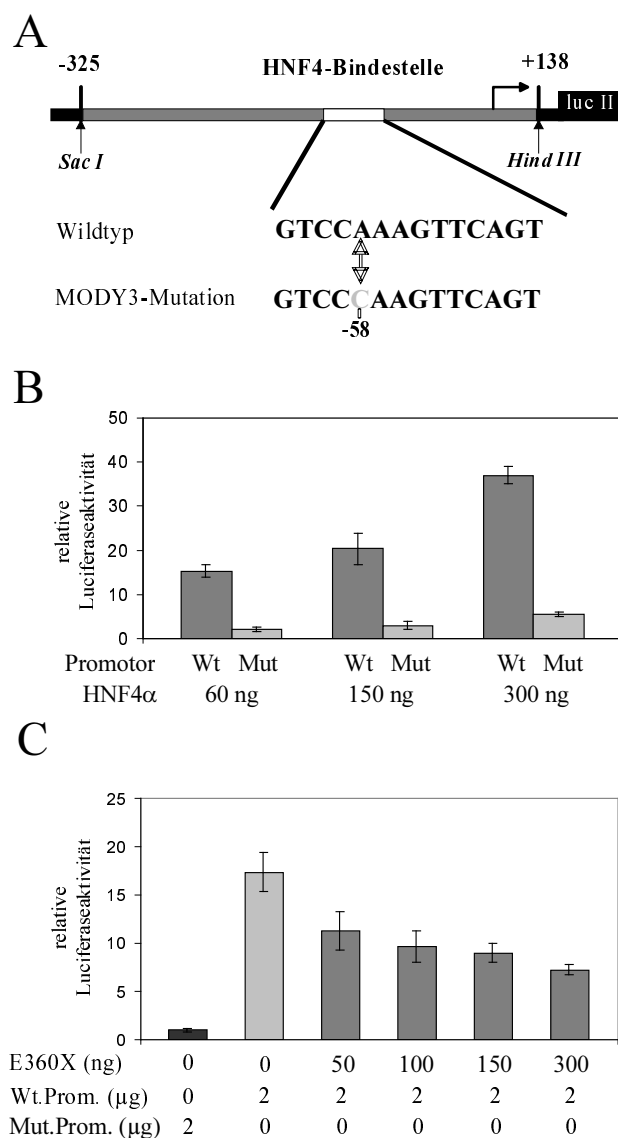


Abbildung 3: (A) Schematische Darstellung des hHNF1(-325/+138)lucII-Konstruktes. Der Bereich der HNF4-Bindestelle und die MODY3-assoziierte Mutation an Position -58, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt, ist eingezeichnet.

(B) Vergleich der Transaktivierung des Wildtyps (Wt) des HNF1 α -Promotors mit dem gleichen Konstrukt, dass die MODY3-Mutation trägt (Mut). Es wurden jeweils 2 μ g Reportergen und die angegebenen Mengen pOPmycHNF4 α Expressionsvektor in HeLa-Zellen transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des entsprechenden Reportergens ohne Transfektion von Expressionsvektor.

(C) Die Aktivität des hHNF1(-325/+138)lucII Reportergens (Wt.Prom.) in INS-1-Zellen im Vergleich zum mutierten Reportergen hHNF1(-325/+138)mut (Mut.Prom.). Die angegebenen Mengen Expressionsvektor für die dominant-negative Mutante E360X und die Reportergene wurden in INS-1-Zellen transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität nach Transfektion mit mutiertem Reportergen. Bei allen Transfektionen wurde die Gesamtmenge DNA mit dem Leervektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

Um zu testen, ob die MODY3-assoziierte Mutation im Promotor von HNF1 α sich auch in β -Zellen auswirkt, wurden INS-1-Zellen als Modell gewählt. INS-1-Zellen sind β -Zellen der Ratte, die HNF1 α , HNF4 α und auch Insulin exprimieren (Wang et al., 1998).

Um die Auswirkung der Mutation in der potentiellen HNF4 α -Bindestelle des HNF1 α -Promotors in INS-1-Zellen zu untersuchen, wurde das mutierte hHNF1(-325/+138)mut-Reportergen in diese Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität mit der Aktivität des Wildtyp-Promotors verglichen. Abbildung 3C zeigt, dass die Aktivität des hHNF1(-325/+138)lucII Promotors stark von der HNF4-Bindestelle abhängig ist. Der Promotor mit der MODY3-assoziierten Mutation ist um den Faktor 17 schwächer als der Wildtyp. In Abbildung 3C wird auch gezeigt, dass die Aktivierung des Wildtyp hHNF1(-325/+138)lucII zum grossen

Teil durch das endogene HNF4 der INS-1-Zellen bewirkt wird. Kotransfektion von 50 ng des Expressionsvektors für die dominant-negative Mutante (E360X), hemmt die Aktivität des Reportergens deutlich. Die Aktivität geht jedoch bei Kotransfektion mit steigenden Mengen der Mutante nicht stark zurück. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Faktoren über die HNF4-Bindestelle aktivieren, die sich nicht durch die dominant-negative Mutante hemmen lassen.

2.2. Der Funktionsverlust des Promotors lässt sich auf den Verlust der HNF4-Bindung durch die MODY3-assozierte Mutation zurückführen.

Da der mutierte HNF1 α -Promotor sich nicht mehr wie der Wildtyp durch HNF4 α transaktivieren lässt, lag es nahe, dass die Mutation die Bindung des HNF4 α -Proteins an den Promotor herabsetzt. Um den Verlust der HNF4 α -Bindung an den mutierten Promotor nachzuvollziehen wurde ein Gelretardationsassay durchgeführt. Dabei wurde ein Oligonukleotid eingesetzt, das den Bereich der Mutation umspannt. In Abbildung 4 ist die Bindung von HNF4 α aus Rattenleberkernextrakt an das radioaktiv markierte hHNF1Prom.-Oligonukleotid gezeigt (Spur 1). Der entstehende DNA/Proteinkomplex lässt sich mit dem gegen den N-Terminus von HNF4 α gerichteten Antikörper H4/55 weiter im Gel retardieren (Spur 2). Gibt man steigende Mengen unmarkiertes Oligonuklotid zum Reaktionsansatz, so verschwindet die markierte DNA/Protein-Bande mit zunehmender Konzentration (Spur 3-8). Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wird also durch unmarkiertes Oligonukleotid verdrängt. Wird das hHNF1Prom.mut.-Oligonukleotid, dass die Mutation trägt, in steigenden Mengen zum Reaktionsansatz gegeben (Spur 9-14), so verdrängt es das markierte Oligonukleotid nicht von HNF4 α . Dies weist die verringerte Affinität des HNF4 α -Proteins an die mutierte Bindestelle nach.

Zusammengefaßt zeigt sowohl die verringerte Induktion des HNF1 α -Promotors durch HNF4 α als auch die durch die Gelretardation nachgewiesene Verringerung der Affinität von HNF4 α für die mutierte Bindestelle, dass die MODY3-assozierte Mutation in der HNF4-Bindestelle zu einem weitgehenden Funktionsverlust des Promotors führt.

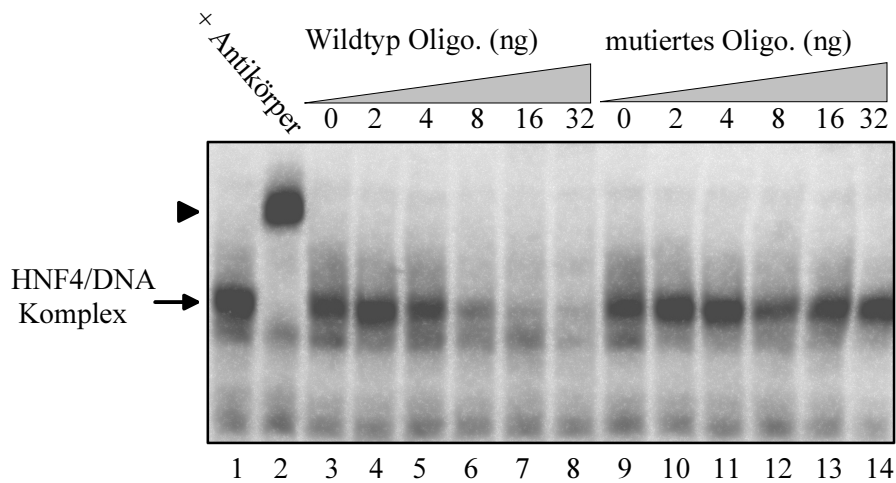


Abbildung 4: Gelretardationsanalyse der HNF4 α -Bindung an die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 α -Promotor im Vergleich zu der mutierten Bindestelle. Die Gelretardationsanalyse wurde mit 0,5 μ l Kernextrakt aus Rattenleber und dem radioaktiv markierten Oligonukleotid hHNF1Prom. mit der Sequenz der HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 α -Promotor durchgeführt. Der im Gel zurückgehaltene HNF4/DNA-Komplex (Pfeil, Spur 1) wird durch den HNF4 α spezifischen Antikörper H4/55 weiter im Gel zurückgehalten (Pfeilspitze, Spur 2). Es wurden steigende Mengen unmarkiertes Wildtyp-Oligonukleotid hHNF1Prom. (Spur 3-8) beziehungsweise unmarkiertes mutiertes Oligonukleotid hHNF1Prom.mut. (Spur 9-14) zum Ansatz gegeben.

3. Die MODY1-Mutationen beeinflussen die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors

3.1. Das Transaktivierungspotential der MODY1-Mutanten

Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten führen zu C-terminal verkürztem HNF4 α -Protein, dem ein Grossteil der E-Domäne fehlt. Die MODY1-assoziierten missense-Mutationen liegen alle in der E-Domäne und führen dort zu Aminosäureaustauschen. Da die E-Domäne von HNF4 α wichtig für die Transaktivierung ist, ist es naheliegend die mit MODY1-assoziierten Mutationen im HNF4 α -Gen mit einer Veränderung in der Transaktivierungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors in Verbindung zu bringen.

Um den Einfluß der MODY1-Mutationen auf die Transaktivierungsfähigkeit von HNF4 α zu testen, wurden die Mutationen zunächst in einen Expressionsvektor für HNF4 α (pOPmycHNF4 α), eingebracht. Das Transaktivierungspotential der Mutanten wurde durch Kotransfektion der entsprechenden Expressionsvektoren mit HNF4-abhängigen Reportergenen in HeLa-Zellen getestet. Zunächst wurden die Expressionsvektoren in sättigender Menge transfiziert. In Abbildung 5A sind die Ergebnisse von Kotransfektionen der entsprechenden Vektoren mit dem hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen dargestellt, Abbildung 5B zeigt die Ergebnisse mit dem H4-tk-luc Reportergen.

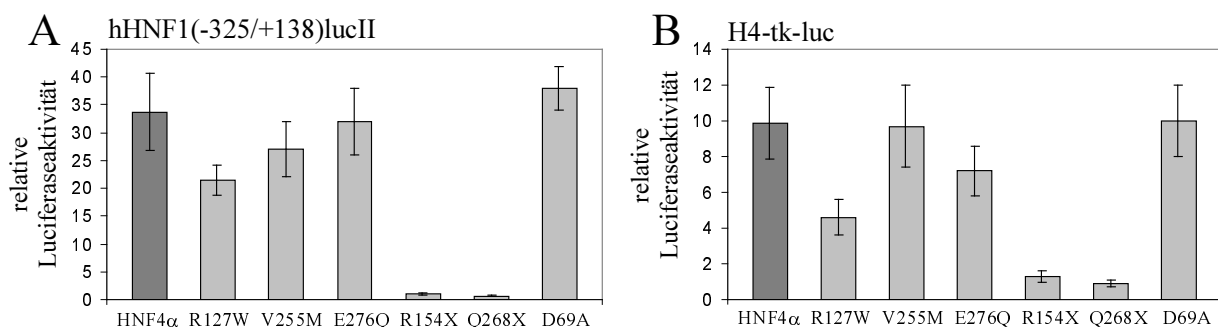


Abbildung 5: Transaktivierungspotential von HNF4 α und seinen Mutanten bei der Transfektion einer sättigenden Menge der entsprechenden Expressionsvektoren (300 ng) in HeLa-Zellen. 2 μ g der Reportergene hHNF1(-325/+138)lucII (A) und H4-tk-luc (B) wurden mit 300 ng Expressionsvektor pOPmycHNF4 α für den Wildtyp-HNF4 α beziehungsweise der entsprechenden Mutante kotransfiziert. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität bei Transfektion mit leerem pOP13-Expressionsvektor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Meßwerten an.

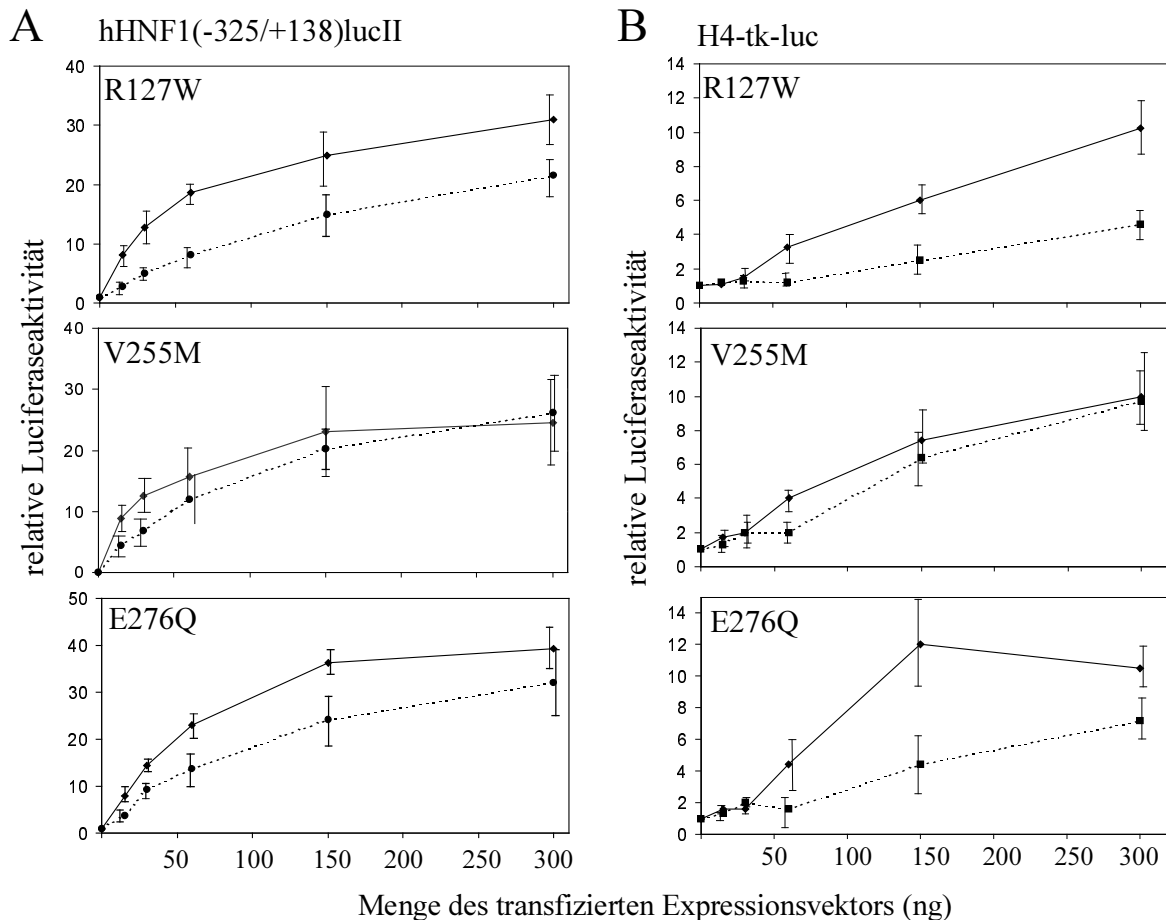


Abbildung 6: Sättigungskurven des Transaktivierungspotentials des HNF4 α -Wildtyps (durchgehende Linie) und der MODY1-assoziierten Mutanten (unterbrochene Linie) auf dem hHNF1(-325/+138)lucII (**A**) und dem H4-tk-luc Reportergen (**B**). Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität bezogen auf den Wert nach Transfektion mit leerem Expressionsvektor pOP13 bei steigenden Mengen des HNF4 α -Expressionsvektors pOPmycHNF4 α und den entsprechenden Expressionsvektoren für die Mutanten. Es wurden jeweils 2 μ g Reportergen und Expressionsvektor in Mengen von 15, 30, 60, 150, und 300 ng in HeLa-Zellen transfiziert. Die DNA-Menge wurde mit dem pOP13-Vektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus sechs unabhängigen Werten an.

Mit beiden Reportergenen konnte gezeigt werden, daß die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X funktionell inaktiv sind. Die MODY1-assoziierten missense-Mutanten V255M und E276Q zeigen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-HNF4 α . Die MODY1-assoziierte missense-Mutante R127W ist jedoch auf beiden Reportergenen weniger aktiv als der Wildtyp.

Um geringfügigere Änderungen im Transaktivierungspotential feststellen zu können, wurden von den MODY1-assoziierten missense-Mutanten Sättigungskurven auf dem hHNF1(-325/+138)lucII (Abbildung 6A) und dem H4-tk-luc (Abbildung 6B) Reportergen erstellt. Die

unterbrochenen Linien stehen für die jeweiligen Mutanten, die durchgezogenen Linien bilden den Wildtyp ab. Für die R127W-Mutante zeigt sich eine Verringerung der Transaktivierungsfähigkeit gegenüber dem Wildtyp bei allen getesteten Konzentrationen des Expressionsvektors. Demgegenüber ist eine Verringerung der Transaktivierung der V255M-Mutante nur bei geringen Konzentrationen (60 ng) des Expressionsvektors und der E276Q-Mutante bei mittleren Konzentrationen (150 ng) festzustellen.

3.2. Die untersuchten MODY1-Mutanten sind nicht dominant-negativ

Da die MODY1-assoziierten Mutationen im Menschen heterozygot vorliegen, ist zu erwarten, dass sowohl das normale Allel als auch das mutierte Allel exprimiert wird. Behält das mutierte Protein seine Eigenschaft, Dimere zu bilden, so kann es durch Interaktion mit dem Wildtyp-Protein die Aktivität desselben hemmen. Dadurch sinkt die Gesamtaktivität des in der Zelle vorhandenen Faktors unter die Aktivität, die bei der Addition der Einzelaktivitäten von Wildtyp-Protein und mutiertem Protein zu erwarten wäre. Besonders Mutanten ohne eigene Aktivität können durch diese dominant-negative Wirkung für den weitgehenden Funktionsverlust des betroffenen Faktors in der Zelle sorgen.

Um zu testen, ob sich eine der MODY1-Mutanten dominant-negativ verhält, wurden je 30 ng Expressionsvektor für den Wildtyp-HNF4 α und die entsprechenden Mutanten gemischt und zusammen mit dem hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen in HeLa-Zellen transfiziert.

Da die MODY1 missense-Mutanten noch eigene Transkriptionsaktivität besitzen, ist bei Kotransfektion gleicher Mengen Expressionsvektor für Wildtyp und Mutante eine Aktivität zwischen Mutante und Wildtyp zu erwarten. Bei einem dominant-negativen Effekt ist die Gesamtaktivität von Wildtyp und Mutante zur Aktivität verschoben, die man bei Transfektion der gleichen Menge Mutante erhält. Abbildung 7A zeigt die Ergebnisse bei Mischung von 30 ng Wildtyp-Expressionsvektor mit 30 ng der MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W, V255M oder E276Q. Die Gesamtaktivität von Wildtyp (30 ng) und Mutante (30 ng) liegt bei allen Mutanten zwischen dem Wert, wie er bei Transfektion der gleichen Menge Wildtyp (60 ng) beziehungsweise Mutante (60 ng) erreicht wird. Die Gesamtaktivität ist bei keiner der missense-Mutanten zum Wert der Mutante verschoben. Ein dominant-negativer Effekt konnte also nicht festgestellt werden.

Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X haben selbst kein Transaktivierungspotential und sind somit typische Kandidaten für dominant-negativ

wirkende Proteine. Es wurden je 30 ng Wildtypvektor und 30 ng Mutante in HeLa-Zellen kotransfiziert. Verhält sich eine der Mutanten dominant-negativ, so ist die Gesamtaktivität zur Mutante verschoben. Im Fall dieser inaktiven Mutanten sollte die Gesamtaktivität also unter der Aktivität liegen, wie sie bei Transfektion von 30 ng Wildtyp erreicht wird. Abbildung 7B zeigt, dass bei Kotransfektion der R154X- oder Q268X-Mutante mit dem Wildtyp, die Gesamtaktivität nicht unter die Aktivität des Wildtyps sinkt. Auch bei Transfektion von dreifachem Überschuß an Mutante sinkt die Gesamtaktivität nicht unter die des Wildtyps bei Transfektion von 30 ng Expressionsvektor (Daten nicht gezeigt). Unter den gewählten Bedingungen zeigte also keine der analysierten MODY1-assoziierten Mutanten einen dominant-negativen Effekt.

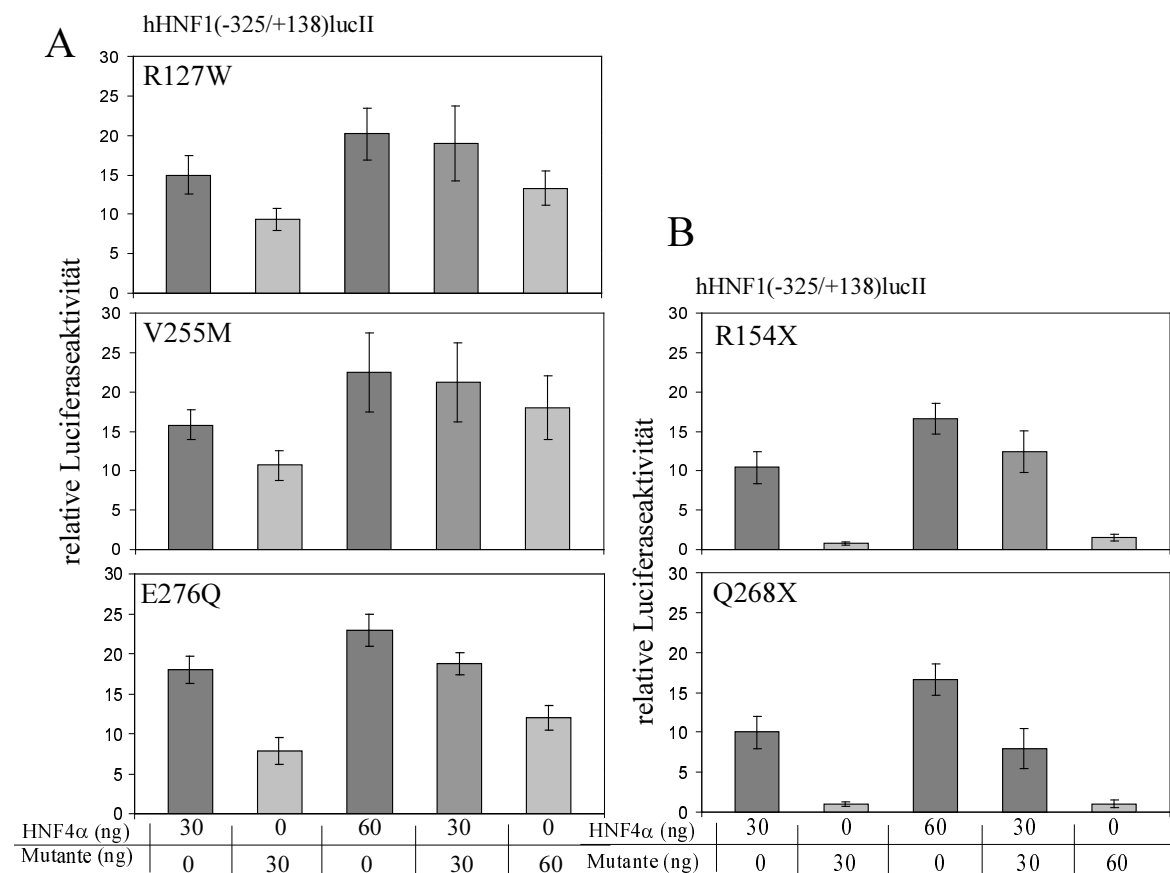


Abbildung 7: Transaktivierungspotential von Wildtyp- und Mutanten-HNF4α auf dem humanen HNF1α-Promotor hHNF1(-325/+138)lucII. **(A)** Kotransfektion des Expressionsvektors für Wildtyp-HNF4α (pOPmycHNF4α) mit dem Expressionsvektor für die MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W, V255M und E276Q. **(B)** Kotransfektion des Expressionsvektors für Wildtyp-HNF4α und den MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X. 2 µg Reportergen wurden zusammen mit den angegebenen Mengen Expressionsvektor in HeLa-Zellen transfiziert, die DNA-Menge wurde durch Zugabe von pOP13-Vektor konstant gehalten. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität nach Transfektion mit dem Leervektor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

nachgewiesen werden. Die R154X-Mutante zeigt zunächst eine schwache DNA-Bindung (Spur 11), nach Zugabe des Antikörpers bildet sich jedoch ein deutlicher DNA/Protein-Komplex (Spur 12). Dies weist auf eine schwache DNA-Bindung des R154X-Proteins hin, die durch die Bindung des Antikörpers verstärkt wird.

In Abbildung 9 ist eine Immunoblotanalyse, der für die Gelretardationen eingesetzten Kernextrakte gezeigt. Wildtyp-HNF4 α und die MODY1-assoziierten missense-Mutanten (Spur 1-4), sowie die nonsense-Mutante R154X (Spur 6) sind deutlich im Kernextrakt nachweisbar. Das Q268X-Protein fehlt im Kernextrakt (Spur 5). Die fehlende DNA-Bindung der Q268X-Mutante im Gelretardationsassay ist somit auf das Fehlen des Proteins im Kernextrakt zurückzuführen. Bei der Herstellung von Kernextrakten werden im letzten Schritt lösliche Kernproteine vom unlöslichen Chromatinpellet getrennt. Eine Immunoblotanalyse dieses Pellets mit dem myc-tag spezifischen Antikörper 9E10 ergab, dass sowohl Wildtyp-HNF4 α als auch die missense Mutanten R127W, V255M, E276Q und die nonsense-Mutante R154X im Pellet nachweisbar sind (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Kernextrakt ist jedoch auch das Q268X-Protein im Pellet nachweisbar (Spur 8), dies weist auf eine veränderte subzelluläre Lokalisation des Q268X-Proteins hin.

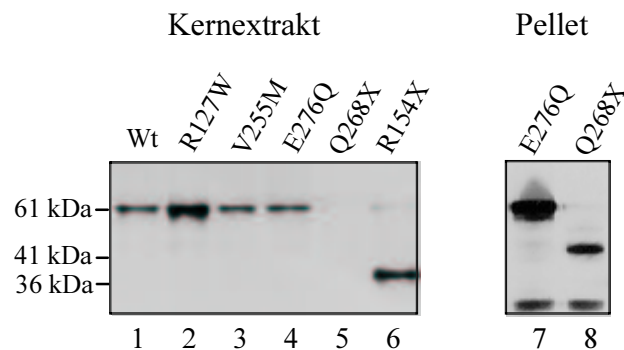


Abbildung 9: Immunoblotanalyse, der für den Gelretardationsassay eingesetzten Kernextrakte. Die Kernextrakte aus HEK293-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit den entsprechenden Vektoren hergestellt. Es wurden 5 μ g Gesamtprotein des Kernextrakts beziehungsweise 10 μ l der Pelletfraktion eingesetzt. Als Erstantikörper dient der myc-tag-spezifische Antikörper 9E10.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen dem Wildtyp und den MODY1 missense-Mutanten im Gelretardationsassay kein Unterschied bezüglich der DNA-Bindefähigkeit gefunden wurde. Die Q268X-Mutante war im Kernextrakt nicht zu detektieren und konnte daher nicht im Bandshift binden. Die R154X-Mutante zeigt in der Gelretardation ein deutlich verringertes DNA-Bindevermögen.

3.4. Subzelluläre Lokalisation der Mutanten

Eine Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zelle kann die Ursache für eine verringerte Aktivität des Transkriptionsfaktors sein. Durch Mutationen im HNF4 α könnte die Lokalisation innerhalb der Zelle verschoben sein, so dass weniger HNF4 α für die Transaktivierung von Genen im Kern zur Verfügung steht.

Um dies zu überprüfen, wurde mit Hilfe des myc-tag-spezifischen Antikörpers 9E10 eine Immunfluoreszenzanalyse in transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass transfiziertes Wildtyp-HNF4 α ausschliesslich im Kern nachweisbar ist. Auch die MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W, E276Q sowie die V255M-Mutante sind ausschliesslich im Kern nachweisbar. Die MODY1-assoziierte nonsense-Mutante R154X konnte zunächst nicht nachgewiesen werden. Durch den Austausch von Methanol durch Paraformaldehyd zur Fixierung der Zellen, konnte die R154X-Mutante jedoch deutlich im Kern lokalisiert werden. Für die Q268X-Mutante ist ebenfalls kein Signal in der Immunfluoreszenz detektierbar, eine Fixierung mit Paraformaldehyd wurde jedoch nicht durchgeführt. Die Immunoblotanalyse (Abbildung 9) zeigt, dass die Q268X-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp ausschliesslich in der unlöslichen Fraktion eines Kernextraktes vorhanden ist. Daher ist anzunehmen, dass das Q268X-Protein andere physikalische Eigenschaften, wie Löslichkeit, als der Wildtyp besitzt.

4. HNF4 α hemmt die Vermehrung von Zellen

Da Menschen, die eine MODY1-Mutation tragen nicht schon bei der Geburt erkrankt sind, muss ein Faktor mit der Zeit immer wichtiger werden, bis die Erkrankung ausbricht. β -Zellen sind einem ständigem Austausch von Zellen unterlegen, dabei sterben β -Zellen durch Apoptose und werden durch Neubildung von β -Zellen ersetzt (Finegood et al., 1995). Eine Störung dieser Neogenese von Zellen durch MODY1-Mutationen könnte mit der Zeit zu einer Verringerung der β -Zell-Population führen. Daher sollte ein Einfluss von HNF4 α auf die Vermehrung von β -Zellen untersucht werden und mit MODY1-Mutanten verglichen werden. Die Mutation D69A aus den HepG2-Zellen wurde in die Untersuchungen einbezogen, da sie möglicherweise tumorassoziiert ist und veränderte Eigenschaften besitzen könnte.

4.1. Die Überexpression von HNF4 α hemmt das Aufwachsen stabiler Klone in INS-1-Zellen

Um einen Einfluss von HNF4 α auf die Vermehrung von β -Zellen zu untersuchen, wurde eine β -Zelllinie ausgewählt. Da keine β -Zelllinie des Menschen zur Verfügung stand, wurde auf INS-1-Zellen, eine β -Zelllinie der Ratte, zurückgegriffen. Diese Zellen exprimieren sowohl HNF4 α als auch HNF1 α . Ausserdem synthetisieren sie Insulin und können daher als Model für differenzierte β -Zellen dienen. Um einen ersten Hinweis auf einen Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung zu bekommen, wurde untersucht, ob HNF4 α das Aufwachsen von stabilen INS-1-Zellklonen stört. Bei dem verwendeten Nachweis wird ein Expressionsvektor für das zu testende Protein in die Zellen transfiziert. Auf dem eingesetzten Plasmid ist gleichzeitig ein Resistenzgen für das Antibiotikum G418 vorhanden. In einer Anzahl von transfizierten Zellen kommt es während der Antibiotikabehandlung zum stabilen Einbau des transfizierten Vektors. Diese Zellen sind dann antibiotikaresistent und können unter Antibiotikaselektion wachsen. Zu einem grossen Anteil exprimieren sie auch das Protein, dessen offener Leserahmen in den Vektor eingebracht wurde. Stört dieses Protein das Zellwachstum, so werden weniger resistente Kolonien aufwachsen als bei der Transfektion mit einem Kontrollvektor. Die Zellen wurden nach Transfektion und Selektion durch Färbung

mit Methylenblau sichtbar gemacht. Die Stärke der Blaufärbung lässt auf die Anzahl der aufgewachsenen Zellen schliessen.

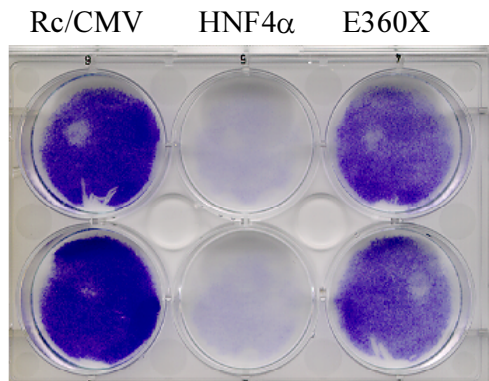


Abbildung 10: HNF4 α inhibiert die Bildung von Kolonien in INS-1 Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse bei Transfektion mit dem Rc/CMV Leervektor, Rc/CMVmycHNF4 α und Rc/CMVmycE360X in Doppelbestimmung. Die INS-1-Zellen wurden mit 2 μ g Expressionsvektor pro 6-well-Schale transfiziert und nach 14 Tagen G418-Selektion (450 μ g/ml) mit Methylenblau angefärbt.

In Abbildung 10 ist gezeigt, dass Transfektion mit Expressionsvektor für HNF4 α das Aufwachsen von resistenten Kolonien stark inhibiert. Zum Vergleich wuchsen nach Transfektion mit dem leeren Rc/CMV Vektor eine grosse Anzahl von Kolonien auf. Die mit Expressionsvektor für die dominant-negative Mutante E360X (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997) transfizierten Zellen zeigten gegenüber dem Rc/CMV-Vektor ein leicht reduziertes, aber signifikantes Aufwachsen der Kolonien.

4.2. Einige MODY1-assoziierte Mutanten reprimieren das Aufwachsen von Zellen nicht wie der Wildtyp

Um den Einfluss von HNF4 α auf das Aufwachsen von Kolonien zu quantifizieren und ihn mit Mutanten von HNF4 α vergleichen zu können, wurde die Zellzahl nach G418-Selektion bestimmt. Eine Stichprobe ergab, dass die dadurch ermittelten Werte den Ergebnissen bei dem Auszählen der Klone entsprechen (Daten nicht gezeigt). Die INS-1-Zellen wurden mit Expressionsvektor für den HNF4 α -Wildtyp beziehungsweise die Mutanten transfiziert.

Die ermittelten Zellzahlen wurden auf den Wert bei Transfektion mit dem Rc/CMV-Leervektor bezogen und als relative Repression angegeben. Abbildung 11 zeigt die starke Repression der Zellvermehrung durch HNF4 α . Die MODY1-assoziierten nonsense-Mutanten R154X und Q268X sowie die E360X-Mutante, reprimieren das Aufwachsen der Zellen nur in dem Maße eines Vektors, der das LacZ-Gen exprimiert (β -gal). Die MODY1-assoziierte missense-Mutante R127W verringert die Zellzahl nicht so stark wie der Wildtyp, die Repression ist hier 3-mal schwächer als beim Wildtyp-HNF4 α . Die MODY1-assoziierten missense-Mutanten E276Q und V255M verursachen die gleiche Reprimierung der

Zellvermehrung wie der Wildtyp und auch die D69A-Mutante aus den HepG2-Zellen zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp.

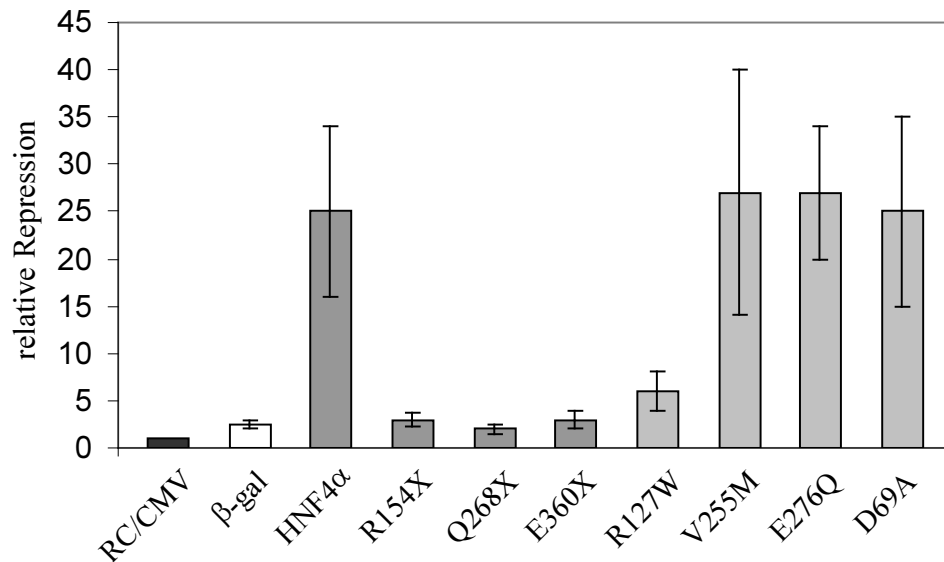


Abbildung 11: Repression des Aufwachsens von INS-1-Zellen nach Transfektion mit Rc/CMVmycHNF4α. Nach Transfektion von 100,000 Zellen pro 24-well-Schale mit 600 ng der entsprechenden Expressionsvektoren und Selektion mit G418 (450 µg/ml) für 14 Tage, wurden die Zellen trypsinisiert und gezählt. Alle Expressionsvektoren basieren auf dem Rc/CMV-Vektor. Die Ergebnisse sind als relative Repression angegeben. Dazu wurde die Zellzahl mit dem leeren Rc/CMV-Vektor durch die Zellzahl der entsprechenden Vektoren dividiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

4.3. Herstellung stabiler induzierbarer Klone

Um die Rolle von HNF4 α in der Zellvermehrung detaillierter zu untersuchen, wurden Zellklone etabliert, die HNF4 α stabil überexprimieren. Der Einfluss von HNF4 α auf die Zellvermehrung kann während der Etablierung stabiler Klone zu einem Selektionsdruck führen. Infolgedessen entstünden nur Klone, die entweder das HNF4 α nicht exprimieren oder in denen der Mechanismus über den HNF4 α auf die Zellvermehrung wirkt gestört wäre. Um diesen Selektionsdruck zu umgehen, wurde ein System der Induktion durch Rekombination nach Angrand (Angrand et al., 1998) angewendet (Abbildung 12). Dieses System benutzt eine konstitutiv exprimierte FLP-Rekombinase, die an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Östrogenrezeptors fusioniert ist (FLP-LBD). Die Ligandenbindungsdomäne ist mutiert, so dass sie nur durch künstliche Liganden wie das Antiöstrogen Tamoxifen aktiviert wird. Nach Aktivierung leitet sie einen Rekombinationsprozess ein, der ein bisher nicht aktives Gen vor den bidirektionalen Promotor bringt und somit die Expression des Gens erlaubt.

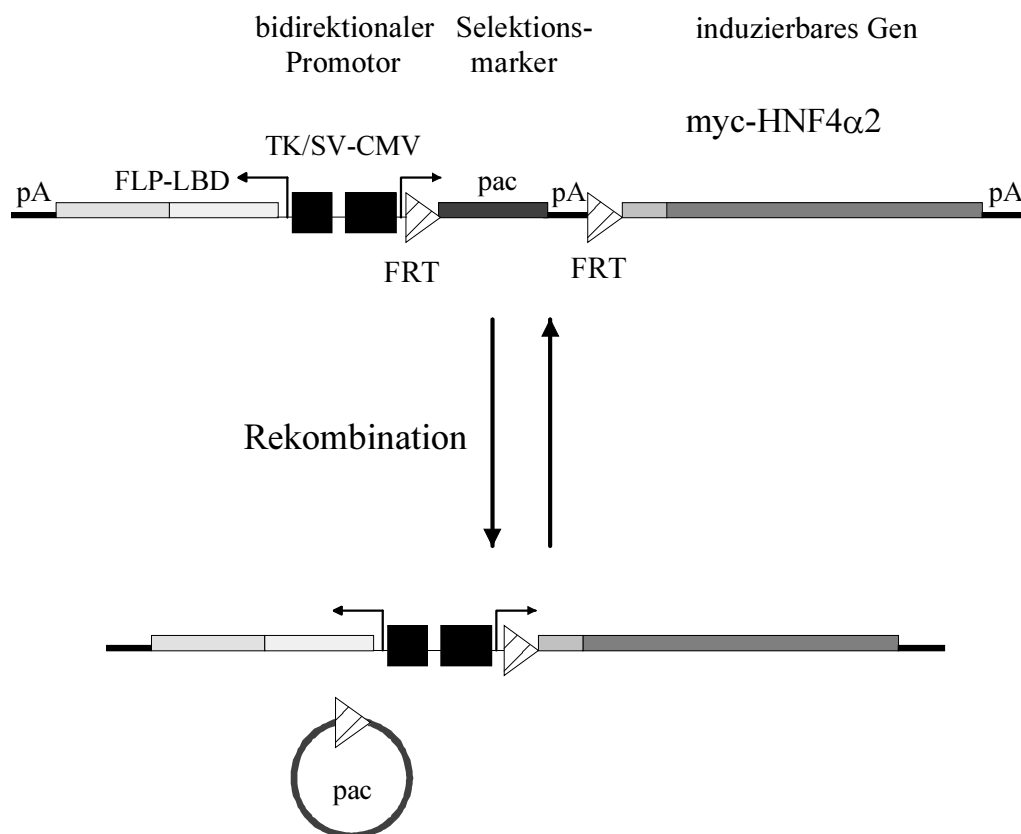


Abbildung 12: Das Expressionssystem zur Herstellung stabiler induzierbarer HNF4 α -Klone.

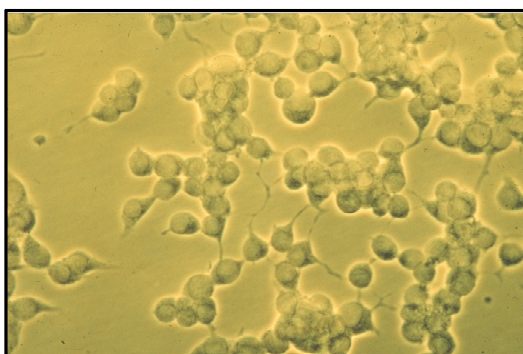
pA: Polyadenylierungssignal, FLP-LBD: FLP-Rekombinase an die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert, TK/SV-CMV: bidirektionaler Promotor, FRT: Erkennungssequenzen für die FLP-Rekombinase, pac: Puromycinresistenzgen

4.4. HNF4 α ist in stabilen INS-1-Klonen induzierbar

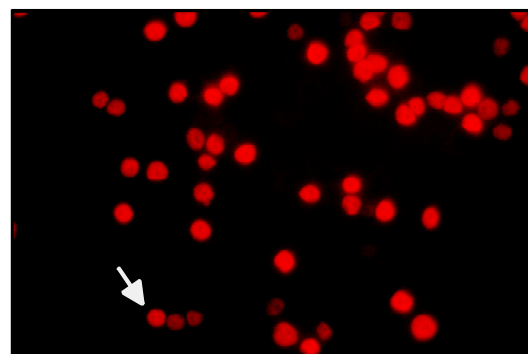
Es wurden sowohl HNF4 α -Wildtyp-Klone hergestellt als auch Klone verschiedener Mutanten. Dazu zählte die MODY1 nonsense-Mutante R154X und die missense-Mutante R127W. Zudem wurde die dominant-negative Mutante E360X und die D69A-Mutante aus den HepG2-Zellen stabil in INS-1-Zellen eingeführt. Als Kontrollklone wurden zusätzlich Klone etabliert, die das LacZ-Gen induzierbar exprimieren.

Da alle HNF4 α -Proteine mit einem myc-tag versehen wurden, konnten die stabilen INS-1-Klone mit Hilfe des myc-tag-spezifischen Antikörpers 9E10 durch Immunfluoreszenz und Immunoblotting auf die Expression der Proteine untersucht werden. Mit Hilfe des 9E10 Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten Zweitantikörpers wurden die Klone zunächst in der Immunfluoreszenzanalyse auf die induzierbare Expression des Transgens getestet. Dabei zeigte sich, dass nur in etwa 10% aller antibiotikaresistenten Klone das Transgen induzierbar war.

Die Immunfluoreszenzanalyse eröffnete die Möglichkeit, die Expression der transgenen Proteine auf Einzelzellniveau zu untersuchen und ergab, dass nicht alle Zellen in den induzierten Klonen ein positives Signal zeigen. In vielen Klonen waren unter 10% aller Zellen Cy3-positiv. Nur in etwa 10% der Klone war die Mehrzahl der Zellen Cy3-positiv. Die Klone mit der grössten Anzahl induzierter Zellen wurden für die weiteren Analysen ausgewählt. Im nicht-induzierten Zustand sind nur einzelne Zellen Cy3-positiv. Abbildung 13 zeigt einen induzierten stabilen Klon, der in etwa 40% aller Zellen ein positives Cy3-Signal in der Immunfluoreszenz aufweist.



Durchlicht



Cy3-Fluoreszenz

Abbildung 13: Immunfluoreszenzanalyse eines stabilen induzierbaren INS-1-Klones. Die Zellen wurden ausgesät und zwei Tage mit Tamoxifen (100 nM) behandelt, danach wurden sie der Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Ein Beispiel für Zellen, die das Transgen nach der Induktion exprimieren, ist mit einem Pfeil markiert.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob in den induzierten Klonen intakte Proteine mit der erwarteten Grösse gebildet werden. Dazu wurde von den ausgewählten Klonen eine Immunoblotanalyse durchgeführt. In Abbildung 14 ist für jeden hergestellten Klontyp ein Klon in der Immunoblotanalyse dargestellt. Der HNF4 α -Wildtyp-Klon INSHNF4#69 (Spur 1-2) exprimiert nach Induktion ein Protein mit der erwarteten Grösse. Der INS-127#114-Klon (Spur 3-4) exprimiert nach Induktion die MODY1 missense-Mutante R127W, dass Protein läuft im Gel auf der gleichen Höhe wie der Wildtyp. Der MODY1 nonsense-Klon INS154#105 exprimiert nach Induktion das verkürzte Protein der R154X-Mutante (Spur 5-6). Der INSdel#47-Klon (Spur 7-8) ist während der Etablierung von HNF4 α -Wildtyp-Klonen entstanden, er exprimiert nach Induktion ein verkürztes Protein, welches etwas grösser als das R154X-Protein ist. Der INS360#35-Klon (9-10) exprimiert wie erwartet ein verkürztes Protein. Der INS69#45-Klon (Spur 11-12) exprimiert das Protein der D69A-Mutante nach Induktion, das in der gleichen Höhe wie der Wildtyp läuft.

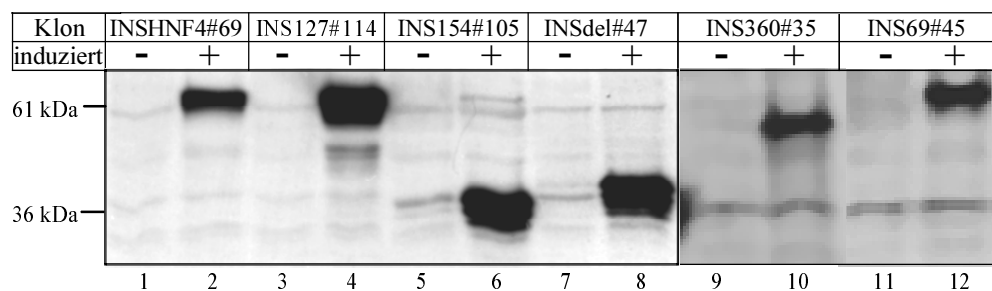


Abbildung 14: Immunoblotanalyse stabiler induzierbarer INS-1-Klone. Die Proteinextrakte wurden entweder von Ethanol-behandelten (-) oder von Tamoxifen-behandelten Klonen (+) hergestellt. Die INS-1-Klone INSHNF4#69, INS127#114, INS154#105, INSdel#47, INS360#35 und INS69#45 wurden durch Transfektion der beschriebenen Expressionsvektoren hergestellt, in denen die entsprechenden Leserahmen für die verschiedenen HNF4 α -Derivate kloniert worden waren. Es wurden jeweils 20 μ g Gesamtprotein für die Analyse eingesetzt, dabei wurde der myc-tag-spezifische Antikörper 9E10 als Erstantikörper und ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper als Zweitantikörper verwendet. Die Spuren 1-8 und 9-12 stammen aus jeweils einem Blot. Die Expressionsstärke kann hier also nur zwischen Klonen des gleichen Blots verglichen werden.

Zur Überprüfung der Funktion der induzierten HNF4 α -Proteine wurde das HNF4 abhängige Reportergen hHNF(-325/+138)lucII in induzierte und nicht-induzierte Klone transfiziert und ein Luciferaseassay durchgeführt. In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass in dem induzierten Wildtyp-Klon INSHNF4#69, dem R127W-Klon INS127#114 und auch in dem D69A-Klon INS69#45 die Aktivität der Luciferase gegenüber dem nicht-induzierten Klon erhöht ist.

Dagegen ist in dem induzierten R154X-Klon INS154#105, dem INSdel#47-Klon und dem E360X-Klon INS360#35 die Aktivität nach Induktion des Transgens erniedrigt.

Im HNF4 α -Wildtyp-Klon, im R127W-Klon und im D69A-Klon transaktivieren die entsprechenden Proteine also das Reportergen. Während das R154X-Protein einen ähnlich starken negativen Effekt auf die Transaktivierung hat wie der Klon der dominant-negativen E360X-Mutante. Das Protein des INSdel#47-Klones hemmt ebenfalls die Aktivität des Reportergens. Dies deutet auf eine Störung der Transaktivierung des endogenen HNF4 α -Proteins der INS-1-Zellen hin. Die Änderung der Transaktivierung ist bei den Klonen gering. Dies könnte auf eine Sättigung der Zellen mit endogenem HNF4 hindeuten.

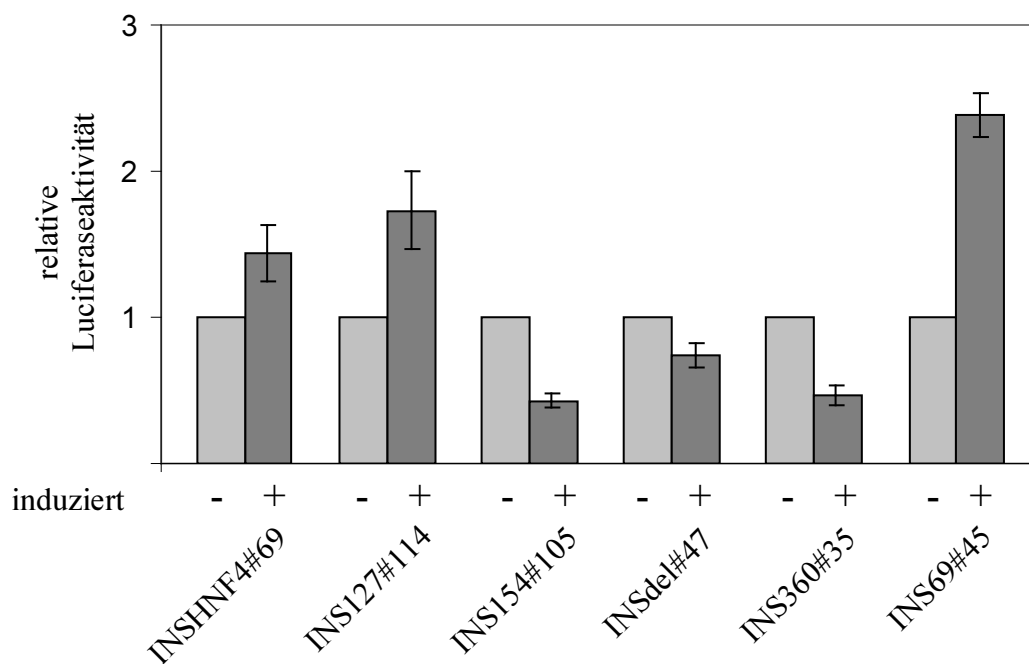


Abbildung 15: Transaktivierungspotential von HNF4 α und seiner Mutanten nach Induktion mit Tamoxifen in stabilen induzierten Klonen. Das Transaktivierungspotential wurde durch einen Luciferaseassay nach Transfektion von 2 μ g des Reportergens hHNF1(-325/+138)lucII in nicht-induzierte und induzierte Klone bestimmt. Die relative Luciferaseaktivität wurde durch Division der Aktivität des induzierten Klones durch die entsprechenden Aktivität des nicht induzierten Klones bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

4.5. Induzierte HNF4 α -INS-1-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung

Die etablierten INS-1-stabilen Klone exprimieren das Transgen nach Induktion nur in einem Teil der Zellen. Dadurch ist es möglich, in einem einzelnen Klon zu untersuchen, ob die Zellen mit HNF4 α -Überexpression einen Nachteil gegenüber den Zellen haben, die das Transgen nicht exprimieren. Bei einem Nachteil in der Zellvermehrung sollte der Anteil der HNF4 α -positiven Zellen in dem induzierten Klon mit der Zeit abnehmen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Anteil das Transgen exprimierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion bestimmt.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dieses Experiments angegeben. Der Anteil der das Transgen exprimierenden Zellen wurde durch Zählen der Cy3-positiven Zellen nach 2, 6 und zwölf Tagen ermittelt. Die HNF4 α -überexprimierenden Klone (INSHNF4#69, INSHNF4#41) zeigen eine deutliche Reduktion des Anteils exprimierender Zellen während der zwölf Tage. Im INSHNF4#69 Klon sind zwei Tage nach Induktion 50% aller Zellen Cy3-positiv, am sechsten Tag nur noch etwa 12% und am zwölften Tag sind kaum noch Cy3-positive Zellen vorhanden. In Klonen der R127W-Mutante (INS127#114, INS127#64), ist ebenfalls eine Reduktion des Anteils exprimierender Zellen während der Untersuchungsdauer zu beobachten, am zwölften Tag sind im Vergleich zu den HNF4 α -Klonen jedoch noch tendenziell mehr exprimierende Zellen übrig. In Klonen der D69A-Mutante (INS69#45, INS69#56) verringert sich der Anteil exprimierender Zellen vergleichbar mit den HNF4 α -Wildtyp-Klonen.

Bei den R154X-Klonen (INS154#105, INS154#95) bleibt der Anteil der exprimierenden Zellen während der zwölf Tage stabil. Auch in dem INS360#35- und dem INSdel#47-Klon, ändert sich der Anteil exprimierender Zellen nicht. Klone, die das LacZ-Gen exprimieren (INSLacZ#5, INSLacZ#1), weisen ebenfalls eine stabile Expression des Transgens über den Zeitraum von zwölf Tagen auf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Anteil exprimierender Zellen mit der Zeit in HNF4 α -Wildtyp-Klonen, sowie in Klonen, die die R127W- oder die D69A-Mutante exprimieren abnimmt. In Klonen welche verkürzte HNF4 α -Proteine exprimieren bleibt die Expression während der Zeit stabil. Auch in LacZ-Klonen, die die funktionell mit dem HNF4 nicht verwandte β -Galaktosidase exprimieren, ändert sich der Anteil der exprimierenden Zellen nicht. Die Abnahme ist also spezifisch für funktionell aktives, volllängen-HNF4 α .

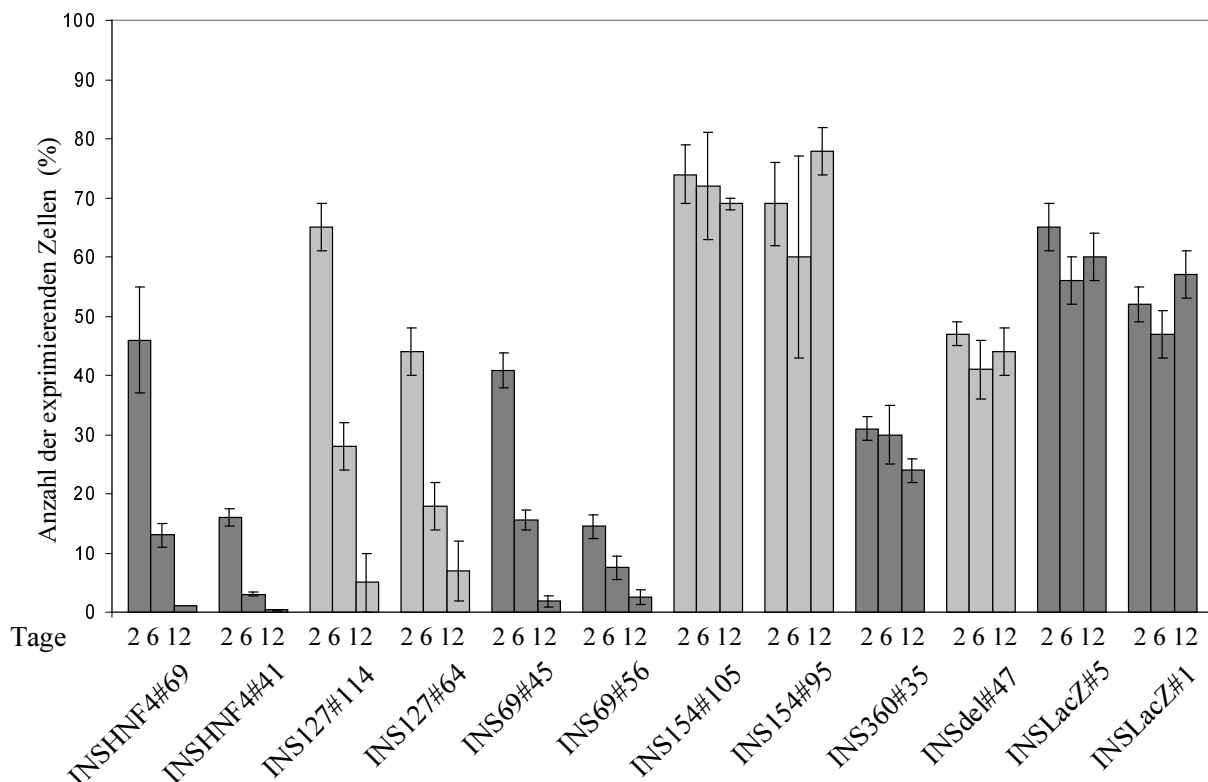


Abbildung 16: Die Anzahl der mycHNF4 α exprimierenden Zellen nimmt in induzierten INS-1-Klonen mit der Zeit ab. Stabile INS-1-Klone des HNF4 α -Wildtyps (INSHNF4#69 und INSHNF4#41), der R127W-Mutante (INS127#114 und INS127#64), R154X-Mutante (INS154#105 und INS154#95) und der E360X-Mutante (INS360#35) sowie der INSdel#47-Klon und die LacZ-Klone INSLacZ#5 und INSLacZ#1 wurden 2, 6 und 12 Tage nach Tamoxifen Behandlung auf die Expression des Transgens hin untersucht. Die Klone wurden durch Immunfluoreszenz mit dem myc-tag-spezifischen Antikörper 9E10 als Erstantikörper und einem Cy3-gekoppelten Antikörper als Zweitantikörper analysiert. Die LacZ-Klone wurden durch β -Galaktosidase-Färbung analysiert. Die Werte geben den prozentualen Anteil der exprimierenden Zellen an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Werten.

Wenn die Abnahme der HNF4 α -positiven Zellen in induzierten Klonen durch eine Hemmung der Zellvermehrung verursacht wird, sollte sich dieses auch auf die Gesamtzellzahl auswirken. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde jeweils ein Klon des Wildtyps und für die verschiedenen Mutanten ausgewählt. Die stabilen Klone wurden induziert und sechs Tage kultiviert, dann wurde die Zellzahl des induzierten und des entsprechenden nicht-induzierten Klon durch Zählen ermittelt. Um die verschiedenen Klone miteinander vergleichen zu können, wurde die Zellzahl für den nicht-induzierten Klon jeweils auf 100% gesetzt.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass im induzierten HNF4 α -Klon INSHNF4#69 die Zellzahl um die Hälfte gegenüber dem induzierten Klon geringer ist. Eine ähnlich geringere Zellzahl gegenüber den nicht-induzierten Klonen zeigen der R127W-Klon INS127#114 und der

D69A-Klon INS69#45, auch hier ist die Zellzahl nach sechs Tagen im induzierten Klon nur halb so gross wie im nicht-induzierten Klon.

Bei den Klonen INS154#105, INS360#35 und Insdel#47 zeigt sich kein Unterschied zwischen dem induzierten und dem nicht-induzierten Klon. Auch im LacZ-Klon INSLacZ#5 ist kein Unterschied zwischen dem induzierten und dem nicht-induzierten Klon zu ermitteln. Bis auf den INS360#35-Klon exprimieren alle in der Abbildung 17 gezeigten Klone das Transgen in mindestens 40% aller Zellen. In Klonen mit geringem Anteil von positiven Zellen ist kein Unterschied in der Zellzahl zwischen induziertem und nicht-induziertem Klon festzustellen (Daten nicht gezeigt).

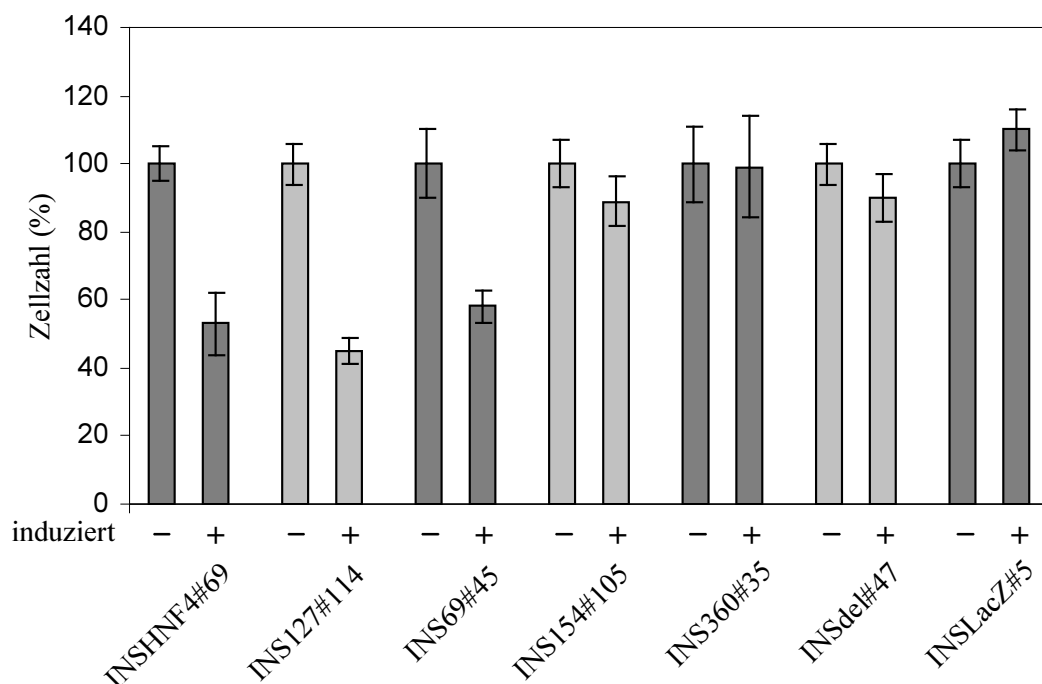


Abbildung 17: Die Gesamtzellzahl ist in induzierten INS-1-HNF4 α -Klonen erniedrigt. Die stabilen Klone wurden in einer Dichte von 50,000 Zellen pro 3,3 cm-Schale ausgesät und mit Tamoxifen induziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl des nicht-induzierten Klon wurde auf 100 Prozent gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten.

Alle Klone, die eine signifikante Verringerung des Anteils an Zellen zeigen, die das Transgen exprimieren (Abbildung 16) vermehren sich im induzierten Zustand langsamer als im nicht induzierten Zustand (Abbildung 17). Diese Klone exprimieren ein volllängen-Protein, dass in der Lage ist, ein Reportergen zu aktivieren (Abbildung 15). In Klonen, die ein verkürztes Protein ohne Transaktivierungspotential exprimieren, ist kein Einfluss auf die Vermehrung der Zellen zu ermitteln.

4.6. HNF4 ist in stabilen HEK293-Klonen induzierbar

HNF4 α hemmt die Zellvermehrung in der β -Zelllinie INS-1 der Ratte. Ob dieser Effekt spezifisch für diese Zelllinie ist oder ob HNF4 α ein ähnliches Potential auch in anderen Zellen hat, wurde in stabilen Klonen von HEK293-Zellen untersucht. HEK293-Zellen sind immortalisierte embryonale Nierenzellen des Menschen. Diese Zellen exprimieren weder HNF4 α noch HNF1 α (Daten nicht gezeigt), daher repräsentieren sie einen relativ undifferenzierten Zelltyp wie er für Tumorzelllinien typisch ist.

Es wurden stabile induzierbare HEK293-Klone mit dem gleichen System hergestellt wie bei den INS-1-Zellen. Der HNF4 α -Wildtyp und die MODY1-assoziierte R154X-Mutante wurden stabil und induzierbar in HEK293-Zellen eingebracht. Ausserdem wurden Kontrollklone hergestellt, die das LacZ-Gen nach Induktion exprimieren. In der Immunfluoreszenzanalyse wurden Klone ausgewählt, die das Transgen in einem grossen Anteil der Zellen exprimieren. Im nicht-induzierten Zustand zeigt eine Minderheit von Zellen (<1%) ein Cy3-positives Signal.

Abbildung 18 zeigt die Immunoblotanalyse mehrerer stabiler HEK293-Klone. Alle Klone zeigen eine starke Expression des Transgens nach Induktion.

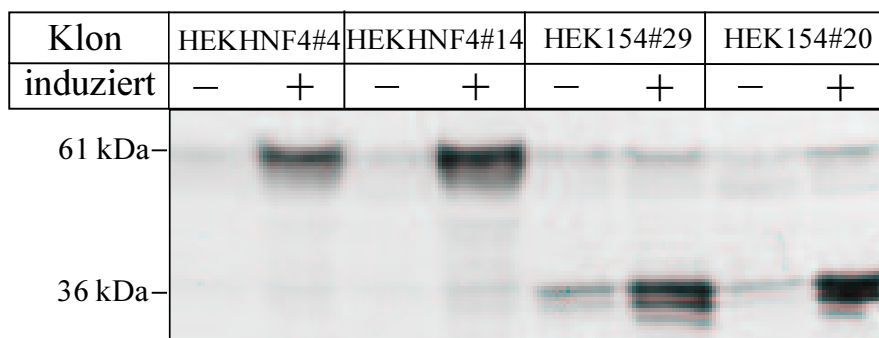


Abbildung 18: Immunoblotanalyse stabiler induzierbarer HEK293-Klone. Die Proteinextrakte wurden entweder von Ethanol- (-) oder Tamoxifen-behandelten Klonen (+) hergestellt. Die HEK293-Klone HEKHNF4#4, HEKHNF4#14, HEK154#29 und HEK154#20 wurden durch Transfektion der beschriebenen Expressionsvektoren hergestellt, in denen die entsprechenden Leserahmen kloniert worden waren. Es wurden jeweils 20 μ g Gesamtprotein für die Analyse eingesetzt und dabei der myc-tag-spezifische Antikörper 9E10 als Erstantikörper und ein Peroxidase-konjugierter Antikörper als Zweitantikörper verwendet.

Nach der Transfektion des hHNF1(-325/+138)lucII Reportergens in den induzierten stabilen HEKHNF4#14-Klon ist eine gegenüber dem nicht-induzierten Klon um das 11-fache erhöhte Luciferaseaktivität zu messen (Abbildung 19). Die Aktivität nach Induktion ist um einiges höher als in den INS-1-Zellen (Abbildung 15), was auf das Fehlen von endogenem HNF4 in HEK293-Zellen begründet werden kann. Im Klon HEK154#29, der die R154X nonsense-Mutante exprimiert kann nur eine 3- bis 4-fache Stimulierung des Reportergens im induzierten Klon im Vergleich zum nicht-induzierten Klon beobachtet werden.

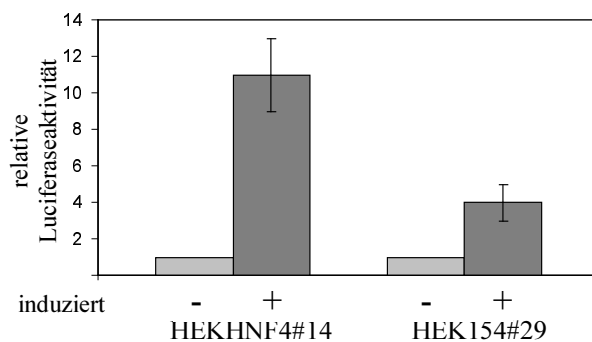


Abbildung 19: Transaktivierungspotential von HNF4 α und seiner Mutanten nach Induktion mit Tamoxifen in stabilen induzierten HEK293-Klonen. Das Transaktivierungspotential wurde durch einen Luciferasereportergenassay nach Transfektion von 2 μ g des Reportergens hHNF1(-325/+138)lucII in nicht-induzierte und induzierte Klone bestimmt. Die relative Luciferaseaktivität wurde durch Division der Aktivität des induzierten Klones durch die entsprechende Aktivität des nicht-induzierten Klones bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

4.7. Induzierte HNF4 α -HEK293-Klone zeigen eine reduzierte Zellvermehrung

Um den Effekt von HNF4 α auf die Zellvermehrung zu untersuchen, wurde 2, 6 und 12 Tage nach Induktion der Anteil der exprimierenden Zellen in den stabilen Klonen bestimmt. Dabei wurde entsprechend der Analyse der stabilen induzierten INS-1-Klone der Anteil der Cy3-positiven Zellen in der Immunfluoreszenzanalyse ausgezählt. Abbildung 20 zeigt, dass in den HNF4 α -Wildtyp-exprimierenden Klonen HEKHNF4#14 und HEKHNF4#4 der Anteil der exprimierenden Zellen im Zeitverlauf abnimmt.

In den induzierten Klonen der MODY1-assoziierten nonsense-Mutante R154X (HEK154#29, HEK154#20) sowie den Klonen HEKLacZ#222 und HEKLacZ#213, die das LacZ-Gen exprimieren, bleibt der Anteil der exprimierenden Zellen während der Untersuchungsdauer stabil.

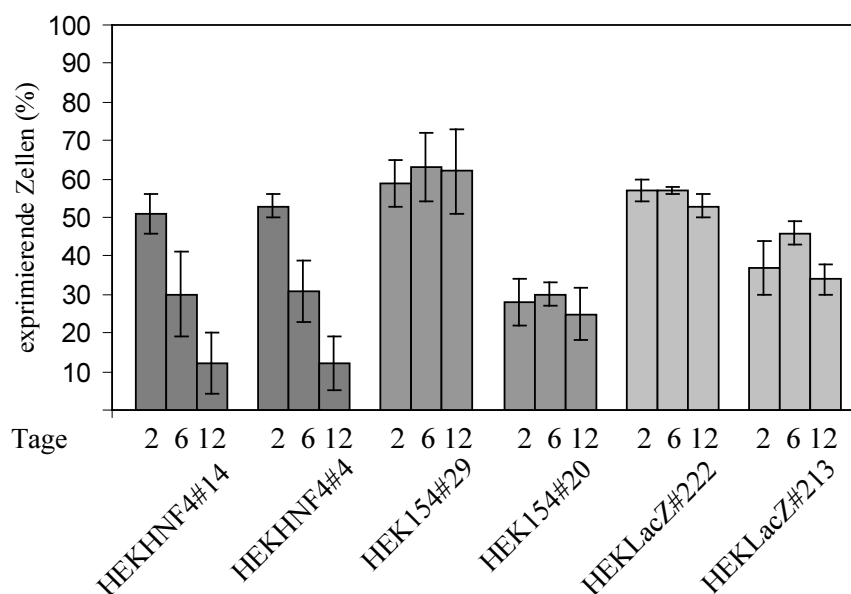


Abbildung 20: Der Anteil der HNF4 α -exprimierenden Zellen nimmt in induzierten HEK293-Klonen ab. Stabile HEK293-Klone von HNF4 α (HEKHNF4#14 und HEKHNF4#4), der R154X Mutante (HEK154#29 und HEK154#20), sowie LacZ-Klone (HEKLacZ222 und HEKLacZ213), wurden 2, 6 und 12 Tage nach Tamoxifenbehandlung auf die Expression des Transgens hin untersucht. Die Klone wurden durch Immunfluoreszenzanalyse mit dem myc-tag-spezifischen Antikörper 9E10 als Erstantikörper und einem Cy3-gekoppelten Antikörper als Zweitantikörper sowie die LacZ-Klone durch β -Galaktosidase-Färbung analysiert. Die Werte geben den prozentualen Anteil der exprimierenden Zellen an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Werten an.

In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Bestimmung der Gesamtzellzahl sechs Tage nach Induktion gezeigt. Die Gesamtzellzahl ist bei dem HNF4 α -exprimierenden Klon HEKHNF4#14 sechs Tage nach der Induktion etwa um die Hälfte geringer als im nicht induzierten Klon. Dagegen ist die Gesamtzellzahl in dem induzierten R154X-Klon HEK154#29 und dem induzierten LacZ-Klons HEKLacZ#222 nicht gegenüber den nicht-induzierten Klonen verändert. Die beobachtete Abnahme der exprimierenden Zellen in den HEKHNF4 α -Klonen (Abbildung 20) korreliert also mit einer geringeren Zellvermehrung.

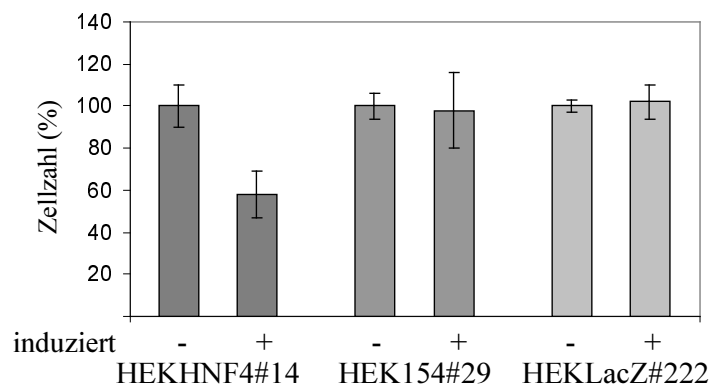


Abbildung 21: Die Gesamtzellzahl ist in induzierten HEK293-HNF4 α -Klonen geringer als in den nicht-induzierten Klonen. Die stabilen Klone wurden in einer Dichte von 50,000 Zellen pro 3,3-cm-Schale ausgesät und mit Tamoxifen induziert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen trypsiniert und die Gesamtzellzahl durch Zählen bestimmt. Die Zellzahl der nicht-induzierten Klone wurde gleich hundert Prozent gesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

IV. Diskussion

1. Die D69A-Mutante ist auf einigen Promotoren aktiver als der Wildtyp

Die D69A-Mutante wurde bei der Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien auf Mutationen im HNF4 α -Gen in der Hepatomazelllinie HepG2 gefunden. Diese Zelllinie wurde 1980 etabliert (Knowles et al., 1980) und ist ein verbreitetes Modell für Leberfunktionen im Menschen. Die D69A-Mutation könnte ein tumorassoziiertes Ereignis sein und zur Tumorentstehung beigetragen haben. Es lag allerdings kein geeignetes Material des ursprünglichen Tumors oder des Patienten vor. Daher konnte nicht geklärt werden, ob die D69A-Mutation schon in der Keimbahn des betroffenen Menschen vorhanden war oder tumorspezifisch ist. Ausserdem besteht die Möglichkeit, dass die Mutation während der Etablierung der Zelllinie entstanden ist. Da das mutierte HNF4 α Allel in dieser Zelllinie exprimiert wird (Lausen et al., 2000), könnte sich das mutierte Protein in den Zellen auswirken. Daher wurde die Mutante in dieser Arbeit funktionell charakterisiert. Es wurde sowohl die Transaktivierungsfähigkeit der D69A-Mutante als auch ihr Potential zur Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Das Transaktivierungspotential der Mutante ist auf dem HNF1 α -Promotor des *Xenopus* xHNF1(-594/-207)lucI und dem ApolipoproteinAI-Promotor aus der Ratte rApoAI(-1000/+14)lucI erhöht, während sie sich auf dem HNF1 α -Promotor des Menschen hHNF1(-325/+138)lucII wie der Wildtyp verhält. Die D69A-Mutation führt also nicht zum Verlust der Fähigkeit zu transaktivieren, sondern eher zu einer Erhöhung derselben (Abb. 2, S. 23).

Die D69A-Mutation betrifft die P-Box im ersten Zinkfinger der DNA-Bindedomäne von HNF4 α . Es ist bekannt, dass die P-Box bei Kernrezeptoren kritisch für die DNA-Bindung ist und die Spezifität der DNA-Bindung leistet. So hat man durch Mutationen innerhalb der P-Box, die Spezifität des Östrogenrezeptors (ER) und des Glukocorticoidrezeptors (GR) für ihre Bindestellen austauschen können (Umesono and Evans, 1989; Mader et al., 1989). Für eine im Menschen vorkommende Mutation in der P-Box des Steroidogenic-Faktor-I ist kürzlich gezeigt worden, dass sie die Spezifität des Rezeptors verändert. Die Autoren vermuten, dass eine veränderte Genexpression durch die veränderte Spezifität des Rezeptors zur Erkrankung des Betroffenen führt (Ito et al., 2000). Wenn durch die D69A-Mutation die Spezifität des Transkriptionsfaktors gegenüber seiner Bindestelle verändert wird, könnte dies die unterschiedliche Transaktivierung erklären. Der zentrale Bereich der HNF4-Bindestelle im

hHNF1(-325/+138)lucII Reportergen ist mit der HNF4-Bindestelle des xHNF1(-549/-207)lucI Reportergen aus dem *Xenopus* identisch, die flankierenden Bereiche unterscheiden sich jedoch. Dieser Unterschied könnte eine grössere Affinität der D69A-Mutante gegenüber der HNF4-Bindestelle des xHNF1(-549/-207)lucI Reportergens bewirken und eine gesteigerte Transaktivierung zur Folge haben. Ob die D69A-Mutante eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Affinität zu unterschiedlichen Bindestellen hat, könnte durch Bandshift-Experimente mit Oligonukleotiden mit variierenden HNF4-Bindestellen analysiert werden. Interessanter schien jedoch zu klären ob die D69A-Mutante einen Beitrag zum Wachstum des Tumors geleistet haben könnte, daher wurde sie in die Analysen zur Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α einbezogen.

Die D69A-Mutante zeigte in INS-1-Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Hemmung der Zellvermehrung gegenüber dem Wildtyp (Abb. 11, S. 37; 16, S. 43 und 17, S. 44). Die D69A-Mutation verändert die Eigenschaft des HNF4 α -Proteins das Wachstum zu hemmen nicht. Eine Beteiligung der D69A-Mutante bei der Tumorentstehung durch eine verminderte Wachstumshemmung aufgrund der Mutation ist daher wenig wahrscheinlich. Falls die D69A-Mutante jedoch wegen einer veränderten Bindspezifität andere Gene reguliert als der Wildtyp, könnte dies eine sekundäre Anpassung des Tumors sein. Wenn die D69A-Mutante zum Beispiel bevorzugt Gene anschaltet, die Tumorzellen einen Vorteil im Wachstum verschaffen, hätten diese Zellen gegenüber den anderen eine Selektionsvorteil. Solche Veränderungen in Tumoren betreffen häufig Gene, die wichtige Stoffwechselprozesse steuern (Dang and Semenza, 1999). Zum Beispiel ist die für den Glucosestoffwechsel wichtige Hexokinase in vielen Tumorzelllinien amplifiziert (Rempel et al., 1996).

2. Eine MODY3-assoziierte Mutation zerstört die HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor

Während die Mehrzahl der MODY3-assoziierten Mutationen im offenen Leserahmen des HNF1 α -Gens gefunden wurden (Ellard, 2000), liegt eine MODY3-assoziierte Mutation in der HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor (Gagnoli et al., 1997). Die Auswirkung dieser Mutation war bis zu dieser Arbeit nicht geklärt. Durch Transfektion in HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass ein Promotorkonstrukt, das die Mutation trägt, im Vergleich zum Wildtyp kaum noch durch transfiziertes HNF4 α aktiviert wird (Abb. 3, S. 25). In der β -Zelllinie INS-1 der Ratte ist der mutierte Promotor im Vergleich zum Wildtyp wenig aktiv, dies weist auf eine

wichtige Rolle der Bindestelle bei der Transaktivierung des HNF1 α -Gens in β -Zellen hin. In β -Zellen lässt sich die Aktivität des Wildtyp-Promotors durch eine dominant-negative HNF4 α -Mutante hemmen, ein Teil der Aktivierung des HNF1 α -Promotors in β -Zellen geht also von endogenem HNF4 α der INS-1-Zellen aus. Da auch hohe Konzentrationen der dominant-negativen Mutante die Aktivität des Promotors nicht weiter hemmen, könnte ein weiterer Faktor das HNF1 α -Gen über die HNF4-Bindestelle aktivieren.

In Gelretardationsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass die mutierte HNF4-Bindestelle eine signifikant verringerte Affinität zum HNF4 α -Protein besitzt (Abb. 4, S.27). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die HNF4-Bindestelle durch die Mutation weitgehend zerstört ist. Die Wichtigkeit der HNF4-Bindestelle für die Expression des HNF1 α -Gens ist auch im *Xenopus* gezeigt worden. Hier verhinderte eine Mutation der HNF4-Bindestelle des *Xenopus* HNF1 α -Promotors die Expression eines HNF1 α -Promotor Transgenes in der Niere (Ryffel and Lingott, 2000). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Regulation von HNF1 α durch HNF4 α bei der Entstehung von MODY wichtig ist und dass es dabei zu einer Verringerung der Expression von HNF1 α kommt. Daher ist der HNF1 α -Promotor für die Analyse von MODY1-assozierten Mutationen des HNF4 α -Gens in Reporterstudien besonders geeignet,

3. Die MODY1-Mutationen bewirken einen Funktionsverlust des HNF4 α -Proteins

Die funktionelle Analyse der MODY1-assozierten HNF4 α -Mutanten zeigte einen unterschiedlich starken Effekt der verschiedenen Mutationen.

Die beiden nonsense-Mutationen R154X und Q268X zeigen bei Transfektion in HeLa-Zellen kein Transaktivierungspotential (Abb. 5, S. 28). Außerdem stören sie das Wildtyp-Protein nicht, sie sind also nicht dominant-negativ (Abb. 7, S. 31). Diese Beobachtung ist für die Q268X-Mutante auch von anderen Gruppen gemacht worden. Das Fehlen eines dominant-negativen Effektes dieser Mutante wurde veränderten Eigenschaften zugeschrieben (Sladek et al., 1998). Diese Annahme konnte durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigt werden. Das Q268X-Protein ist in Kernextrakten aus transfizierten HEK293-Zellen nur in der Pelletfraktion zu finden (Abb. 9, S. 33).

Demgegenüber ist das R154X-Protein wie der Wildtyp im Kernextrakt nachweisbar. Im Gelretardationsassay zeigt sich nur nach Zugabe eines Antikörpers eine deutliche DNA-Bindung (Abb. 8, S. 32). Dies weist auf eine schwache DNA-Bindung des Proteins hin, die durch den Antikörper stabilisiert wird. Die DNA-Bindefähigkeit der R154X-Mutante ist nicht unerwartet, denn in einer Deletionsstudie zeigte eine vergleichbare C-terminale Deletionsmutante ebenfalls eine DNA-Bindung (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Im Unterschied zum Wildtyp kann die R154X-Mutante in der Immunfluoreszenzanalyse nicht nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit Methanol fixiert wurden. Bei Fixierung mit Paraformaldehyd ist die Mutante wie der Wildtyp im Kern nachweisbar. Das unterschiedliche Verhalten bezüglich der Fixierung deutet auf ein verändertes physikalisches Verhalten der Mutante hin, zum Beispiel könnte die Löslichkeit des Proteins verändert sein. Inzwischen ist die R154X-Mutante auch von anderen charakterisiert worden (Laine et al., 2000). Im Einklang mit den gezeigten Daten stellten die Autoren einen Verlust der Transaktivierungsfähigkeit bei Transfektion der Mutante in COS-1- und HIT-T15-Zellen fest. In HEK293-Zellen hat die R154X-Mutante eine Restaktivität. Diese Restaktivität in HEK293-Zellen zeigt sich auch in den in dieser Arbeit hergestellten induzierbaren HEK293-Klonen der R154X-Mutante (Abb. 19, S. 46). In HIT-T15-Zellen stellen die Autoren sogar einen leicht dominant-negativen Effekt fest.

Zusammenfassend belegen die Daten zur Q268X- und R154X-Mutante einen Funktionsverlust der Mutanten, sie stellen sogenannte „loss of function“ Mutationen dar.

Die beiden MODY1-assoziierten missense-Mutanten R127W und E276Q haben die Fähigkeit, ein Reportergen zu transaktivieren, nicht vollständig verloren. Sie transaktivieren jedoch deutlich schwächer als der Wildtyp (Abb. 6, S. 29). Bei der R127W-Mutante wird dies schon bei sättigender Menge transfizierten Expressionsplasmids deutlich bei der E276Q-Mutante erst bei mittleren Mengen. Die V255M-Mutante verhält sich bei hohen und mittleren Konzentrationen wie der Wildtyp, bei niedrigen Konzentrationen zeigt sich eine reduzierte Transaktivierung. Die untersuchten missense-Mutanten sind aufgrund ihrer geringeren Transaktivierung also ebenfalls „loss of function“ Mutanten.

Nach Abschluss der Transaktivierungsstudien mit den MODY1-Mutanten wurden auch von anderen Arbeitsgruppen funktionelle Daten zu diesen MODY1-Mutanten präsentiert. Demzufolge transaktivieren die R127W- und V255M-Mutanten wie der Wildtyp (Navas et al., 1999). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit untersuchten Navas et al. die Transaktivierung der Mutanten nur bei hohen Konzentrationen von Expressionsvektor, ausserdem haben sie Zelltypen für ihre Analysen benutzt, die bereits endogenes HNF4 α

besitzen. Durch die grosse Menge Wildtyp-HNF4 α könnten geringfügigere Unterschiede der Mutante gegenüber dem Wildtyp übersehen worden sein. Auch wurde die E276Q-Mutante von Navas et al. als funktionell inaktiv eingestuft. Die Autoren haben die Mutationen jedoch ins Ratten-HNF4 α und nicht ins HNF4 α des Menschen eingeführt, dies könnte den Unterschied zu den Daten aus der vorliegenden Arbeit erklären. Inzwischen ist die E276Q-Mutante jedoch, in Übereinstimmung mit meinen Daten, als aktiv beschrieben worden (Suaud et al., 1999). Die Autoren vermuten, dass eine verminderte Synergie der E276Q Mutante, mit COUP-TFII (chicken upstream ovalbumin promotor transcription factor II) zur geringeren Transaktivierung durch diese Mutante führt.

Mittlerweile sind sieben zusätzliche Mutanten im HNF4 α -Gen im Zusammenhang mit Diabetes beschrieben worden. Zwei weitere MODY1-assozierte Mutanten sind funktionell analysiert worden, die missense-Mutanten V391I (Hani et al., 1998) und G115S (Malecki et al., 1999) zeigen ein signifikant verringertes Transaktivierungspotential. Die frameshift-Mutanten F75fs (Möller et al., 1999) und K99fs (Lehto et al., 1999a) sind mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls „loss of function“ Mutationen, da Deletionskonstrukte mit ähnlicher Länge nicht mehr aktiv sind (Jiang and Sladek, 1997). Für die MODY1-assozierten missense-Mutanten I454V (Malecki et al., 1999) und R324H (Price et al., 2000) sowie die Insertionsmutante V328-329ins (Lehto et al., 1999b) liegen bisher keine funktionellen Daten vor.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen MODY1-Mutanten weisen eine verringerte Transaktivierung auf, diese ist jedoch je nach Mutation unterschiedlich stark ausgeprägt. Ein dominant-negativer Effekt des mutierten Proteins gegenüber dem Wildtyp ist nicht allgemeiner Mechanismus der MODY1-Mutationen, denn er ist nur in schwacher Ausprägung für die R154X-Mutante ermittelt worden (Laine et al., 2000).

Für einige MODY1-Mutationen ist noch nicht endgültig geklärt, ob sie tatsächliche MODY1-Mutationen sind oder nur Polymorphismen, die mit dem wirklich für MODY verantwortlichen Genlokus kosegregieren. Um die verschiedenen Mutationen in dieser Hinsicht zu beurteilen, können mehrere Kriterien herangezogen werden. Bei einer Mutation in einer Familie mit einem grossen Stammbaum kann statistisch gut abgesichert werden, ob die Mutation mit dem Auftreten der Krankheit korreliert. Wenn eine MODY-assozierte Mutation in mehr als einer Familie auftritt ist dies ebenfalls ein deutlicher Hinweis, dass die Mutation für die Krankheit verantwortlich ist. Einen guten Hinweis auf die Relevanz einer Mutation können funktionelle Daten geben, denn bei einer Mutation, die eine Funktionsveränderung der Mutante gegenüber dem Wildtyp verursacht ist es wahrscheinlich, dass sie sich auch im

Patienten auswirkt. Ausserdem kann die Verfügbarkeit klinischer Daten dazu beitragen zu entscheiden zu welchem Typ einer Krankheit die Mutation beiträgt. Im Fall von MODY muss zum Beispiel unterschieden werden ob eine Mutation mit MODY oder einer anderen Form von Diabetes assoziiert ist.

Für einige Mutanten ist der Zusammenhang mit MODY1 aufgrund der Verfügbarkeit grosser Familienstammbäume und der funktionellen Daten gut belegt. Zu den sicheren MODY1 Mutationen zählen aufgrund eines nachgewiesenen oder wahrscheinlichen Funktionsverlust diejenigen Mutanten, die zu einem verkürzten Protein führen (F75fs, K99fs, R154X und Q268X) sowie die missense-Mutationen G115S und die Insertionsmutante V328-329ins (siehe auch: Sladek and Seidel, 2001).

Die funktionellen Daten zur R127W-Mutation sind bisher noch kontrovers. Allerdings ist die Mutation in zwei unabhängigen Familien gefunden worden (Bulman et al., 2000; Furuta et al., 1997) und die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten belegen einen deutlichen Funktionsverlust der Mutante. Daher kann sie zu den sicheren MODY1-Mutationen gezählt werden.

Die E276Q-Mutation ist bisher nur in einer Familie gefunden worden (Bulman et al., 1997). Alle funktionellen Daten zur E276Q-Mutante sprechen allerdings für einen Funktionsverlust durch die Mutation. Daher ist es wahrscheinlich, dass die E276Q-Mutation MODY1-assoziert ist.

Die V255M wurde in 4 von 477 NIDDM Patienten gefunden (Möller et al., 1997), die jedoch nicht für klinische Untersuchungen zur Verfügung standen. Die in dieser Arbeit ermittelten funktionellen Daten zeigen nur einen geringen Funktionsverlust durch die Mutation. Daher spricht vieles dafür, dass die V255M-Mutation eher ein seltener Polymorphismus ist oder die Entwicklung von Typ-II Diabetes fördert.

4. HNF4 α hemmt das Aufwachsen von INS-1-Zellen

Um eine mögliche Rolle von HNF4 α bei der Zellvermehrung zu überprüfen, wurde zunächst das Aufwachsen von Zellen nach Transfektion mit einem Expressionsvektor für HNF4 α in INS-1-Zellen untersucht. Die INS-1-Zelllinie ist eine β -Zelllinie der Ratte. Sie exprimiert HNF4 α , HNF1 α und Insulin und ist deshalb als Modell für differenzierte β -Zellen gut geeignet.

Der Versuchsansatz ergab eine starke Repression des Aufwachsens der Zellen bei Transfektion mit HNF4 α (Abb. 11, S. 37). Im Gegensatz dazu zeigen die MODY1-assoziierten Mutanten R154X und Q268X keine und die MODY1 missense-Mutation R127W nur eine geringe Inhibition des Aufwachsens von Zellen. Dahingegen hemmt die MODY1-assoziierte missense-Mutante E276Q, die V255-Mutante, sowie die in HepG2-Zellen gefundene Mutante-D69A, das Aufwachsen von Zellen im gleichen Maße wie der Wildtyp.

Um die Auswirkung von HNF4 α in der Zellvermehrung genauer zu untersuchen, wurden stabile induzierbare Klone der Ratten β -Zelllinie INS-1 hergestellt. Dazu wurde ein System der Induktion durch Rekombination mit FLP benutzt (Abb. 12, S. 38). Das induzierbare Gen kann mit diesem System zu einem definierten Zeitpunkt durch Gabe von Tamoxifen ins Zellkulturmedium eingeschaltet werden. In den hergestellten Klonen exprimierten 30 bis 70% aller Zellen das Transgen nach Induktion. Diese unvollständige Expression innerhalb eines Klones wurde bei allen isolierten Klonen unabhängig von dem induzierten Gen beobachtet, daher scheint sie eine Eigenschaft dieses Systems zu sein. Dasselbe Phänomen wurde bei einem ähnlichen System beobachtet, das eine Cre-Rekombinase benutzt (Fuhrmann-Benzakein et al., 2000). Dies spricht dafür, dass eine Rekombination in allen Zellen eines Klones schwer zu erreichen ist.

Da in einem Klon nicht alle Zellen das Transgen nach der Induktion exprimieren, ist es möglich zu bestimmen, ob die HNF4 α -überexprimierenden Zellen in der Vermehrung einen Nachteil gegenüber den Zellen haben, die das Transgen nicht exprimieren. Dazu wurde die Prozentzahl der exprimierenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion bestimmt (Abb. 16, S. 42). Es zeigte sich, dass der Anteil der HNF4 α -überexprimierenden Zellen in INS-1-HNF4 α -Klonen (INSHNF4#69, INSHNF4#41) mit der Zeit abnimmt. Die Gesamtzellzahl in dem induzierten HNF4 α -Klon (INSHNF4#69) war nach sechs Tagen in Kultur im Vergleich zu dem nicht-induzierten Klon geringer (Abb. 17, S. 44). Daher kann die

Abnahme des Anteils HNF4 α -überexprimierender Zellen mit einer verlangsamten Vermehrung der Zellen erklärt werden, die HNF4 α exprimieren.

In Klonen, die die MODY1-assoziierte missense-Mutante R127W exprimieren (INS127#114, INS127#64) wurde ebenfalls eine Verringerung des Anteils der exprimierenden Zellen beobachtet. Das gleiche Ergebniss zeigen Klone, die die D69A-Mutante exprimieren (INS69#45, INS69#57). In dem R127W-Klon (INS127#114) und dem D69A-Klon (INS69#45) wuchsen im induzierten Klon ebenfalls weniger Zellen auf als im nicht induzierten Klon.

Kein Effekt auf die Zellvermehrung kann hingegen im INSdel#47-Klon beobachtet werden, der nach Induktion ein verkürztes HNF4 α -Derivat exprimiert. Dieser Klon ist eine gute Kontrolle für den Versuchsansatz und zeigt, dass für die Wachstumshemmung ein intaktes HNF4 α -Protein nötig ist. Die stabilen Klone INS154#105 und INS154#95 exprimieren die MODY1-assoziierte Mutante R154X nach Induktion, in beiden Klonen kann keine Veränderung der Zellvermehrung festgestellt werden. Die Eigenschaft des Wildtyp-Proteins, die zur Hemmung der Zellvermehrung führt, ist durch die R154X-Mutation offensichtlich gestört. Für den INS360#35-Klon, der nach Induktion ein verkürztes Protein mit dominant-negativen Eigenschaften exprimiert, ist ebenfalls kein Effekt auf das Aufwachsen von Zellen zu ermitteln.

Zusammengefasst zeigte die Überexpression von HNF4 α in INS-1-Zellen, dass HNF4 α die Fähigkeit hat, die Zellvermehrung zu inhibieren, während die R154X-Mutante diese Eigenschaft des Wildtyps vollständig verloren hat. Wohingegen die R127W-Mutante, wenn überhaupt, nur einen schwachen Verlust dieser Eigenschaft aufweist. Im Gegensatz dazu verhält sich die D69A-Mutante, unter den gewählten Versuchsbedingungen, vollständig wie der Wildtyp. Die Ergebnisse legen nahe, dass für die Hemmung der Zellvermehrung ein intaktes HNF4 α -Protein erforderlich ist. Alle getesteten Mutanten, die die Vermehrung hemmen, weisen ein signifikantes Transaktivierungspotential auf. Dies unterstützt die Vorstellung die Hemmung der Zellvermehrung könnte über die genregulatorische Funktion von HNF4 α vermittelt werden. Die HNF4 α -Mutanten, die die Zellvermehrung nicht inhibieren haben kein Transaktivierungspotential mehr, sie sind allerdings auch verkürzt. Daher könnte auch eine gestörte Interaktion mit anderen Proteinen für die Hemmung verantwortlich sein. Bekannte Interaktionspartner von HNF4 α sind zum Beispiel CBP (cAMP response element binding protein binding protein) (Dell and Hadzopoulou-Cladaras, 1999) und COUP-TF (Ktistaki and Talianidis, 1997). Gerade die Interaktion von HNF4 α mit CBP ist interessant, da CPB als Tumorsuppressor fungieren kann (Kung et al., 2000) und die

Eigenschaft besitzt zwischen unterschiedlichen Signalwegen zu vermitteln (Goodman and Smolik, 2000). CPB interagiert mit dem N-Terminus von HNF4 α , der nicht durch die MODY1-Mutationen betroffen ist. Trotzdem könnten strukturelle Veränderungen des HNF4 α -Proteins durch die Mutationen zu einer gestörten Interaktion führen. Solch eine gestörte Interaktion sollte bei MODY1-Patienten allerdings von Geburt an ausgeprägt sein. Da die MODY1-Mutationsträger jedoch erst später erkranken ist es wenig wahrscheinlich, dass die Störung einer spezifischen Interaktion von HNF4 α , zum Beispiel mit CBP, zur MODY Erkrankung führt. Zudem berichtet die einzige Studie zu dieser Möglichkeit im Falle der R127W-Mutante von einer normalen Interaktion mit CBP (Yang et al., 2000).

5. HNF4 hemmt die Vermehrung von HEK293-Zellen

Da das HNF4 α -Protein in Nierentumoren herunterreguliert ist (Sel et al., 1996), könnte HNF4 α eine Rolle bei der Entwicklung von Nierenzellkarzinomen spielen. Die Beeinflussung der Zellvermehrung durch HNF4 α könnte beim Prozess der Tumorentstehung von Bedeutung sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK293 ausgewählt. Diese Zelllinie repräsentiert einen relativ undifferenzierten Zelltyp, wie er typisch für eine Tumorzelllinie ist. HEK293-Zellen exprimieren kein HNF4 α oder HNF1 α . Es wurden stabile induzierbare HEK293-Zelllinien mit dem gleichen System hergestellt wie für die INS-1-Zellen beschrieben. Nach Induktion der HEK293-HNF4 α -Klon HEKHNF4#4 und HEKHNF4#14 war innerhalb der Versuchsdauer eine Reduktion des Anteils exprimierender Zellen zu beobachten (Abb. 20, S. 47). Das Auszählen der Gesamtzellzahl ergab eine Verlangsamung der Zellvermehrung im induzierten HNF4 α -Klon, im Vergleich zum nicht induzierten Klon (Abb.21, S. 48). Die Spezifität dieses Effektes wurde durch Klone belegt die nach Induktion entweder die R154X-Mutante oder β -Galaktosidase exprimieren. Diese Klone zeigen weder eine Abnahme der Prozentzahl exprimierender Zellen während der Versuchsdauer noch eine verringerte Vermehrung der Zellen.

Der Effekt von HNF4 α auf die Vermehrung von Zellen in stabilen induzierbaren Klonen der Nierenzelllinie HEK293 unterstützt die Annahme HNF4 α könnte bei der Tumorentstehung beteiligt sein, und eventuell als Tumorsuppressor wirken. Es sind bisher jedoch keine tumorassoziierten Mutationen im HNF4 α -Gen gefunden worden (persönliche Mitteilung: Prof. G.U. Ryffel, Institut für Zellbiologie, Essen). Daher kann man spekulieren, dass der

Verlust der HNF4 α -Expression in Nierenzellkarzinomen, durch den Verlust von Faktoren hervorgerufen wird, die für die HNF4 α -Expression wichtig sind. Eine interessante Beobachtung ist hier ein möglicher Zusammenhang von HNF4 α -Expression und dem TGF β - (transforming growth factor beta) Signalweg. Der TGF β -Signalweg besitzt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung. Beim TGF β -Signalweg aktivieren extrazelluläre Liganden wie Aktivin oder BMP (bone morphogenic factor) durch Binden an einen membranständigen Rezeptor eine Signalkaskade, die in der Beeinflussung der Genexpression mündet. Mutationen in diesem Signalweg sind für eine Reihe von Tumorerkrankungen ursächlich (Zusammengefasst in: Massague et al., 2000). Aus Untersuchungen im *Xenopus* weiss man, dass die Aktivierung der HNF1 α -Expression nach Aktivin-Gabe, über eine HNF4-Bindestelle vermittelt wird (Weber et al., 1996). Ausserdem induziert BMP die Expression von HNF4 α in „embryonic bodies“ (Coucovanis and Martin, 1999). Die Beantwortung der Frage, ob eine Interaktion von HNF4 α mit dem TGF β -Signalweg für die Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α im Zusammenhang steht, könnte ein entscheidender Schritt zum Verständniss der Wirkungsweise von HNF4 α darstellen.

6. HNF4 α und Erkrankungen des Menschen

HNF4 α ist ein wichtiges Gen in der Entwicklung von Vertebraten, zudem sind Mutationen im HNF4 α -Gen ursächlich für MODY1. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten unterstützen die These, dass die Regulation von HNF1 α (MODY3) durch HNF4 α (MODY1) wichtig bei der Entstehung von MODY1 ist

Da eine mit MODY3-assoziierte Mutation die HNF4-Bindestelle im HNF1 α -Promotor zerstört, ist davon auszugehen, dass durch die Mutation die Expression des HNF1 α -Gens im betroffenen Patienten reduziert ist. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass MODY3-Mutationen im HNF1 α -Gen die Aktivität des Transkriptionsfaktors senken (Vaxillaire et al., 1999). Für eine verringerte Transaktivierung des HNF1 α -Gens aufgrund MODY1-assoziiierter Mutationen im HNF4 α -Gen spricht auch, dass die analysierten MODY1-assoziierten Mutanten ein geringeres Transaktivierungspotential auf dem HNF1 α -Promotor aufweisen als der Wildtyp. Das reduzierte Transaktivierungspotential des in einer Zelle vorhandenen HNF4 α -Proteins könnte sich dann mittelbar über eine verringerte Aktivierung des HNF1 α -

Gens auswirken. Dies würde bedeuten, dass MODY1 und MODY3 über denselben Mechanismus zum Diabetes führen. Einen wichtigen Hinweis auf diese Möglichkeit haben Zellkulturexperimente in INS-1 Zellen erbracht. Das Inhibieren von HNF1 α durch ein induzierbares, dominant-negatives Protein führt zur verringerten Expression einer Reihe von Genen, die wichtig für die Glucosehomöostase sind. Dazu gehören der Glucosetransporter-2 (GLUT-2), die L-Pyruvatkinase (L-PK), die Aldolase-B und Insulin (Wang et al., 2000a). Diese Zellen sind in ihrer Insulinsekretion gestört. In einem ähnlichen Versuchsansatz gelang es der gleichen Arbeitsgruppe, das HNF4 α -Protein in INS-1-Zellen zu inhibieren. Interessanterweise sind hier HNF1 α und auch die oben genannten HNF1 α -Zielgene herunterreguliert (Wang et al., 2000b). Genau wie bei der Inhibierung von HNF1 α zeigen auch diese Zellen eine gestörte Insulinsekretion. Das regulative Potential des HNF1 α -Gens für das Insulin-Gen des Menschen ist inzwischen belegt (Okita et al., 1999). Dies spricht für die Möglichkeit, dass sich HNF4 α -Mutationen über HNF1 α mittelbar auf die Expression des Insulin-Gens auswirken. Sowohl HNF4 α als auch HNF1 α sind für die Expression einer grossen Anzahl von Genen wichtig, die zur Glucosehomöostase beitragen. Eine Beteiligung dieser Gene bei der Entwicklung von MODY ist daher wahrscheinlich.

Diese Hypothese beantwortet jedoch nicht die Frage, warum MODY1 Mutationsträger nicht von Geburt an erkrankt sind, sondern sich die Krankheit erst im Jugendalter ausprägt. Eine Erklärung könnte sein, dass die verringerte Expression des HNF4 α -Gens eine Zeitlang kompensiert werden kann. Möglicherweise sinkt die Expressionsstärke von HNF4 α in der Jugendentwicklung, oder der Bedarf für HNF4 α steigt in der Entwicklung an, so dass sich die Mutationen zu einem späteren Zeitpunkt stärker auswirken als zur Geburt. Dafür spricht, dass sich bei MODY1-Patienten deutliche Defekte nur im Pankreas zeigen und in der Leber nur ein schwacher Einfluss auf die Genexpression, zum Beispiel des Gens für ApolipoproteinAI, berichtet wird (Shih et al., 2000). In der Leber ist aufgrund der starken Expression von HNF4 α eine verringerte HNF4 α -Aktivität sicherlich eher auszugleichen als im Pankreas, in dem HNF4 α eher schwach exprimiert wird (Miquerol et al., 1994; Sladek and Seidel, 2001). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass Mutationen in der HNF4 α -Bindestelle im Promotor für Blutgerinnungsfaktoren Hämophilie verursachen, MODY1-Patienten jedoch nicht an Hämophilie leiden. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur Mutation in der HNF4-Bindestelle des HNF1 α -Gens, die sich als MODY3 ausprägt und kann als Argument für eine bessere Möglichkeit zur Kompensation einer verringerten HNF4 α -Expression in Geweben ausserhalb des Pankreas gelten.

Eine weiterer Grund für die Ausprägung der MODY1-Mutationen erst im jungen Erwachsenenalter könnte eine fortschreitende Veränderung der β -Zellpopulation des endokrinen Pankreas sein. Zur Erhaltung der β -Zellmasse ist eine kontinuierliche Neubildung von β -Zellen notwendig, um den Verlust durch Apoptose auszugleichen (Finegood et al., 1995). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Beteiligung von HNF4 an diesem Prozess nahe, der bei MODY1-Patienten gestört sein könnte. Ein veränderter HNF4 α -Status der β -Zellen könnte die Proliferation der β -Zellen verändern, so dass die Anzahl der reifen Insulinproduzierenden β -Zellen abnimmt. Es ist anzunehmen, dass im Laufe der Entwicklung die Anzahl der intakten β -Zellen kritisch wird und der Diabetes ausbricht. Dies könnte insbesondere dann der Fall sein, wenn die β -Zellmasse aufgrund eines erhöhten Bedarfs für Insulin ansteigt, wie bei Gewichtszunahme und Schwangerschaft. In diesem Fall kann man spekulieren, dass die Expression des Wildtyp HNF4 α -Allels in einigen β -Zellen mit der Zeit verloren geht. Dadurch entstünde ein Wachstumsvorteil dieser Zellen gegenüber den β -Zellen, die noch Wildtyp-HNF4 α exprimieren. Die Zellen mit inaktiviertem HNF4 α wären nun in der Insulinsekretion defekt, da sie nur noch das Allel mit der MODY1-Mutation exprimieren und würden die anderen β -Zellen überwachsen. Der Anteil der defekten β -Zellen nähme dann mit der Zeit zu und würde so zur Progression der Krankheit beitragen. Dieses Modell schlägt also eine fortschreitende Zunahme HNF4 α -defizienter β -Zellen in MODY1-Patienten als Ursache für die Krankheit vor. Die Inaktivierung des HNF4 α -Gens könnte sowohl durch somatische Mutation im bisher intakten HNF4 α -Allel, als auch durch eine Inaktivierung der Transkriptionseinheit des HNF4 α -Gens geschehen. Eine solche Inaktivierung wäre vergleichbar mit der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgenes bei der Krebsentstehung, wenn ein Allel des Gens bereits in der Keimbahn mutiert ist (Fearon, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Daten präsentiert, die eine Hemmung der Vermehrung von Zellen durch HNF4 α belegen. Eine Aufklärung des Mechanismus über den HNF4 α wirkt, könnte entscheidend zur Beantwortung der Frage beitragen wie MODY entsteht und neue Therapieansätze ermöglichen. Darüber hinaus wird zu klären sein, ob die Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α ein in der Tumorentstehung bedeutender Prozess darstellt. Die Frage ob MODY1-Patienten eine erhöhte Tumorfrequenz besitzen wurde bisher noch nicht untersucht, allerdings ist die Rate von Nierenkarzinomen in Diabetes Patienten allgemein erhöht (Lindblad et al., 1999).

V. Zusammenfassung

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α spielt eine zentrale Rolle in der Differenzierung von Hepatocyten und seine Expression geht in Nierenzellkarzinomen des Menschen verloren. In der Hepatomazelllinie HepG2 wird ein mutiertes HNF4 α -Allel exprimiert, diese Mutation betrifft die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors. Im Menschen führen Mutationen im HNF4 α -Gen zu „maturity onset diabetes of the young 1“ (MODY1), einer monogenen Form des nicht Insulin abhängigen Diabetes-mellitus. Ausserdem führt eine Mutation in der HNF4 α -Bindestelle im Promotor des HNF1 α -Gens zu MODY3.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die D69A-Mutante aus der Hepatomazelllinie HepG2 auf einigen Promotoren stärker als der Wildtyp transaktiviert. Die D69A-Mutante verhält sich im Hinblick auf die Hemmung der Zellvermehrung in stabilen INS-1-Klonen wie der Wildtyp. Die geringe Funktionsänderung gegenüber dem Wildtyp macht eine ursächliche Beteiligung der Mutante bei der Tumorentstehung wenig wahrscheinlich.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass eine MODY3-assozierte Mutation im HNF1 α -Gen einen Verlust der HNF4 α -Bindestelle des HNF1 α -Promotors verursacht, durch diese Mutation wird im betroffenen MODY3-Patienten also wahrscheinlich die Expression des HNF1 α -Gens gestört. Die Daten zeigen weiterhin, dass die Transaktivierung durch die MODY1-assozierten Mutanten R127W, R154X, V255M, Q268X und E276Q abhängig von der Art der Mutation im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Eine Inaktivierung des Wildtyp Proteins durch die Mutanten ist kein allgemeiner Mechanismus bei der Entstehung von MODY1, denn es gibt nur bei der R154X-Mutante Hinweise auf einen schwachen dominant-negativen Effekt.

Sowohl die verringerte Transaktivierung der MODY1-Mutanten als auch der festgestellte Funktionsverlust der HNF4 α -Bindestelle unterstützt die These, dass sich MODY1-Mutationen über eine verminderte Expression des HNF1 α -Gens auswirken.

In dieser Arbeit wurden erstmals Daten präsentiert, die eine Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α belegen. Die Überexpression von HNF4 α in der β -Zelllinie INS-1 der Ratte führt zu einer geringeren Vermehrung der Zellen, diese Eigenschaft die Zellvermehrung zu hemmen ist in einigen MODY1-Mutanten verlorengegangen. Ausserdem ist die Zellvermehrung in induzierbaren HNF4 α -INS-1-Klonen nach Induktion verlangsamt. Dies

spiegelt sich in der progressiven Verringerung des Anteils HNF4 α -exprimierender Zellen innerhalb eines Klonen wider. Eine ähnliche Verminderung des Anteils HNF4 α -exprimierender Zellen zeigt sich in induzierbaren HEK293-Klonen. Dieser Einfluss von HNF4 α in den undifferenzierten HEK293-Zellen unterstützt die Annahme HNF4 α könnte an der Entstehung von Nierentumoren beteiligt sein.

In einem Modell zur Entstehung von MODY1 wird der fortschreitende Verlust der HNF4 α -Aktivität in β -Zellen des Pankreas als Ursache für die Krankheit vorgeschlagen. Nach diesem Modell geht die Expression des intakten Allels bei MODY1-Patienten in einigen β -Zellen verloren. Diese HNF4 α -defizienten β -Zellen sind in der Insulinsekretion defekt und haben einen Wachstumsvorteil gegenüber den β -Zellen, die noch HNF4 α exprimieren. Durch den Wachstumsvorteil nimmt der Anteil der defekten β -Zellen zu, dies trägt zur Progression der Krankheit bei.

Die Eigenschaft von HNF4 α die Vermehrung von Zellen zu hemmen könnte in MODY1-Patienten gestört sein, ein Verlust dieser Eigenschaft könnte zur Entstehung von Tumoren beitragen.

Literatur

Angrand,P.O., Woodroffe,C.P., Buchholz,F., and Stewart,A.F. (1998). Inducible expression based on regulated recombination: a single vector strategy for stable expression in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 3263-3269.

Asfari,M., Janjic,D., Meda,P., Li,G., Halban,P.A., and Wollheim,C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol dependent differentiated insulin secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-178.

Bailly,A., Spaeth,G., Bender,V., and Weiss,M.C. (1998). Phenotypic effects of the forced expression of HNF4 and HNF1 α are conditioned by properties of the recipient cell. *J. Cell Sci.* 111, 2411-2421.

Barbacci,E., Reber,M., Ott,M., Breillat,C., Huetz,F., and Cereghini,S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126, 4795-4805.

Barroso,I., Gurnell,M., Crowley,V.E., Agostini,M., Schwabe,J.W., Soos,M.A., Maslen,G.L., Williams,T.D., Lewis,H., Schafer,A.J., Chatterjee,V.K., and O'Rahilly,S. (1999). Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402, 880-883.

Bingham,C., Ellard,S., Allen,L., Bulman,M., Shepherd,M., Frayling,T., Berry,P.J., Clark,P.M., Lindner,T., Bell,G.I., Ryffel,G.U., Nicholls,A.J., and Hattersley,A.T. (2000). Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 beta. *Kidney Int.* 57, 898-907.

Bogan,A.A., Dallas-Yang,Q., Ruse,M.D., Jr., Maeda,Y., Jiang,G., Nepomuceno,L., Scanlan,T.S., Cohen,F.E., and Sladek,F.M. (2000). Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4 α . *J. Mol. Biol.* 302, 831-851.

Bulla,G.A. (1997). Selective loss of the hepatic phenotype due to the absence of a transcriptional activation pathway. *Somat. Cell Mol. Genet.* 23, 185-201.

Bulman,M.P., Dronsfield,M.J., Frayling,T., Appleton,M., Bain,S.C., Ellard,S., and Hattersley,A.T. (1997). A missense mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 α gene in a UK pedigree with maturity onset diabetes of the young. *Diabetologia* 40, 859-862.

Bulman,M.P., Ellard,S., and Hattersley,A.T. (2000). R127W in HNF4 α is a loss of function mutation causing maturity-onset diabetes of the young (MODY) in a UK Caucasian family. *Diabetologia* 43, 1203.

Burris,T.P. (2001). The nuclear receptor superfamily. In: *Nuclear receptors and genetic disease*, T.P.Burris and E.R.B.McCabe (eds.), Academic Press, pp. 1-58.

Carew,J.A., Pollak,E.S., Lopaciuk,S., and Bauer,K.A. (2000). A new mutation in the HNF4 binding region of the factor VII promoter in a patient with severe factor VII deficiency. *Blood* 96, 4370-4372.

- Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10, 267-282.
- Chen, W.S., Manova, K., Weinstein, D.C., Duncan, S.A., Plump, A.S., Prezioso, V.R., Bachvarova, R.F., and Darnell, J.E., Jr. (1994). Disruption of the HNF4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8, 2466-2477.
- Chung, A.C.K. and Cooney, A.J. (2001). Retinoid receptors. In: Nuclear receptors and genetic disease, T.P. Burris and E.R.B. McCabe (eds.), Academic press, pp. 245-295.
- Coucouvanis, E. and Martin, G.R. (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126, 535-546.
- Dang, C.V. and Semenza, G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24, 68-72.
- Dell, H. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (1999). CREB-binding protein is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear factor 4 and enhances apolipoprotein gene expression. *J. Biol. Chem.* 274, 9013-9021.
- Dressel, U. and Baniahmad, A. (2001). Thyroid hormone receptors. In: Nuclear receptors and genetic disease, T.P. Burris and E.R.B. McCabe (eds.), Academic press, pp. 59-96.
- Drewes, T., Clairmont, A., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (1994). Estrogen inducible derivatives of hepatocyte nuclear factor 4, hepatocyte nuclear factor 3 and liver factor B1 are differently affected by pure and partial antiestrogens. *Eur. J. Biochem.* 225, 441-448.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G.U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell Biol.* 16, 925-931.
- Duncan, S.A., Nagy, A., and Chan, W. (1997). Murine gastrulation requires HNF4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of HNF4(-/-) embryos. *Development* 124, 279-287.
- Duncan, S.A., Navas, M.A., Dufort, D., Rossant, J., and Stoffel, M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281, 692-695.
- Ellard, S. (2000). Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α) mutations in maturity onset diabetes of the young. *Hum. Mutat.* 16, 377-385.
- Emens, L.A., Landers, D.W., and Moss, L.G. (1992). Hepatocyte nuclear factor 1 alpha is expressed in a hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7300-7304.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* 5, 3610-3616.
- Fearon, E.R. (1997). Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278, 1043-1050.

- Finegood,D.T., Scaglia,L., and Bonner-Weir,S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44, 249-256.
- Froguel,P. and Velho,G. (1999). Molecular genetics of maturity onset diabetes of the young. *Trends Endocrinol. Metab* 10, 142-146.
- Fuhrmann-Benzakein,E., Garcia-Gabay,I., Pepper,M.S., Vassalli,J.D., and Herrera,P.L. (2000). Inducible and irreversible control of gene expression using a single transgene. *Nucleic Acids Res.* 28, E99.
- Furuta,H., Iwasaki,N., Oda,N., Hinokio,Y., Horikawa,Y., Yamagata,K., Yano,N., Sugahiro,J., Ogata,M., Ohgawara,H., Omori,Y., Iwamoto,Y., and Bell,G.I. (1997). Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46, 1652-1657.
- Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14 , 121-141.
- Goodman,R.H. and Smolik,S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14, 1553-1577.
- Gragnoli,C., Lindner,T., Cockburn,B.N., Kaisaki,P.J., Gragnoli,F., Marozzi,G., and Bell,G.I. (1997). Maturity onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene. *Diabetes* 46, 1648-1651.
- Hadzopoulou-Cladaras,M., Kistanova,E., Evagelopoulou,C., Zeng,S.Y., Cladaras,C., and Ladias,J.A.A. (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 272, 539-550.
- Hani,E.H., Suaud,L., Boutin,P., Chevre,J.C., Durand,E., Philippi,A., Demenais,F., Vionnet,N., Furuta,H., Velho,G., Bell,G.I., Laine,B., and Froguel,P. (1998). A missense mutation in hepatocyte nuclear factor 4 alpha, resulting in a reduced transactivation activity, in human late onset non insulin dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 101, 521-526.
- Hattersley,A.T. (1998). Maturity onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet. Med.* 15, 15-24.
- Hertz,R., Magenheimer,J., Berman,I., and Bar-Tana,J. (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor 4 alpha. *Nature* 392, 512-516.
- Holewa,B., Pogge v.Strandmann,E., Zapp,D., Lorenz,P., and Ryffel,G.U. (1996). Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 α (LFB1). *Mech. Dev.* 54, 45-57.
- Holewa,B., Zapp,D., Drewes,T., Senkel,S., and Ryffel,G.U. (1997). HNF4 β , a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 17, 687-694.
- Ito,M., Achermann,J.C., and Jameson,J.L. (2000). A naturally occurring steroidogenic factor 1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *J. Biol. Chem.* 275, 31708-31714.

- Jiang,G., Nepomuceno,L., Hopkins,K., and Sladek,F.M. (1995). Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5131-5143.
- Jiang,G. and Sladek,F.M. (1997). The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *272*, 1218-1225.
- Kapitskaya,M.Z., Dittmer,N.T., Deitsch,K.W., Cho,W.L., Taylor,D.G., Leff,T., and Raikhel,A.S. (1998). Three isoforms of a hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor with tissue and stage specific expression in the adult mosquito. *J. Biol. Chem.* *273*, 29801-29810.
- Knowles,B.B., Howe,C.C., and Aden,D.P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* *209*, 497-499.
- Ktistaki,E. and Talianidis,I. (1997). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2790-2797.
- Kumar,R. and Thompson,E.B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* *64*, 310-319.
- Kung,A.L., Rebel,V.I., Bronson,R.T., Ch'ng,L.E., Sieff,C.A., Livingston,D.M., and Yao,T.P. (2000). Gene dose dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev.* *14*, 272-277.
- Kuo,C.J., Conley,P.B., Chen,L., Sladek,F.M., Darnell,J.E., Jr., and Crabtree,G.R. (1992). A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell type specification. *Nature* *355*, 457-461.
- Laine,B., Eeckhoutte,J., Suaud,L., Briche,I., Furuta,H., Bell,G.I., and Formstecher,P. (2000). Functional properties of the R154X HNF4 α protein generated by a mutation associated with maturity onset diabetes of the young, type 1. *FEBS Lett.* *479*, 41-45.
- Laudet,V., Hänni,C., Coll,J., Catzefis,F., and Stehelin,D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* *11*, 1003-1013.
- Lausen,J., Thomas,H., Lemm,I., Bulman,M., Borgschulze,M., Lingott,A., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4 α gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res.* *28*, 430-437.
- Lee,Y.H., Sauer,B., and Gonzalez,F.J. (1998). Laron dwarfism and non insulin dependent diabetes mellitus in the HNF1 α knockout mouse. *Mol. Cell Biol.* *18*, 3059-3068.
- Lehto,M., Bitzen,P.O., Isomaa,B., Wipemo,C., Wessman,Y., Forsblom,C., Tuomi,T., Taskinen,M.R., and Groop,L. (1999a). Mutation in the HNF4 α gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* *48*, 423-425.
- Lehto,M., Wipemo,C., Ivarsson,S.A., Lindgren,C., Lipsanen-Nyman,M., Weng,J., Wibell,L., Widen,E., Tuomi,T., and Groop,L. (1999b). High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early onset diabetes. *Diabetologia* *42*, 1131-1137.

- Li,J., Ning,G., and Duncan,S.A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF4 α . *Genes Dev.* 14, 464-474.
- Lindblad,P., Chow,W.H., Chan,J., Bergstrom,A., Wolk,A., Gridley,G., McLaughlin,J.K., Nyren,O., and Adami,H.O. (1999). The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia* 42, 107-112.
- Lindner,T., Gragnoli,C., Furuta,H., Cockburn,B.N., Petzold,C., Rietzsch,H., Weiss,U., Schulze,J., and Bell,G.I. (1997). Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha/MODY1 gene. *J. Clin. Invest* 100, 1400-1405.
- Love,j.d., Gooch,J.T., Nagy,L., Chatterjee,K.K., and Schwabe,J.W.R. (2000). Transcriptional repression by nuclear receptors: Mechanism and role in disease. *Biochemical Society Transactions* 28, 390-396.
- Mader,S., Kumar,V., de Verneuil,H., and Chambon,P. (1989). Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid responsive element. *Nature* 338, 271-274.
- Malecki,M.T., Yang,Y., Antonellis,A., Curtis,S., Warram,J.H., and Krolewski,A.S. (1999). Identification of new mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene among families with early onset Type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 16, 193-200.
- Malloy,P.J., Pike,J.W., and Feldman,D. (1999). The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin-D resistant rickets. *Endocr. Rev.* 20, 156-188.
- Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., and Chambon,P. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Massague,J., Blain,S.W., and Lo,R.S. (2000). TGF β signaling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- McKenna,N.J., Lanz,R.B., and O'Malley,B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, 321-344.
- McNair,A., Cereghini,S., Brand,H., Smith,T., Breillat,C., and Gannon,F. (2000). Synergistic activation of the atlantic salmon hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 promoter by the orphan nuclear receptors HNF4 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I (COUP-TFI). *Biochem. J.* 352 Pt 2, 557-564.
- Miquerol,L., Lopez,S., Cartier,N., Tulliez,M., Raymondjean,M., and Kahn,A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* 269, 8944-8951.
- Möller,A.M., Dalgaard,L.T., Ambye,L., Hansen,L., Schmitz,O., Hansen,T., and Pedersen,O. (1999). A novel Phe75fsdelT mutation in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in a Danish pedigree with maturity onset diabetes of the young. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 367-369.

- Möller,A.M., Urhammer,S.A., Dalgaard,L.T., Reneland,R., Berglund,L., Hansen,T., Clausen,J.O., Lithell,H., and Pedersen,O. (1997). Studies of the genetic variability of the coding region of the hepatocyte nuclear factor 4 alpha in caucasians with maturity onset NIDDM. *Diabetologia* 40, 980-983.
- Morrissey,E.E., Tang,Z., Sigrist,K., Lu,M.M., Jiang,F., Ip,H.S., and Parmacek,M.S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 12, 3579-3590.
- Nakhei,H., Lingott,A., Lemm,I., and Ryffel,G.U. (1998). An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 α predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic. Acids. Res.* 26, 497-504.
- Nastos,A., Pogge v.Strandmann,E., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1998). The embryonic expression of the tissue specific transcription factor HNF1 α in *Xenopus*: rapid activation by HNF4 and delayed induction by mesoderm inducers. *Nucleic. Acids. Res.* 26, 5602-5608.
- Navas,M.A., Munoz-Elias,E.J., Kim,J., Shih,D., and Stoffel,M. (1999). Functional characterization of the MODY1 gene mutations HNF4(R127W), HNF4(V255M), and HNF4(E276Q). *Diabetes* 48, 1459-1465.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999 (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161-163.
- Okita,K., Yang,Q., Yamagata,K., Hangenfeldt,K.A., Miyagawa,J., Kajimoto,Y., Nakajima,H., Namba,M., Wollheim,C.B., Hanafusa,T., and Matsuzawa,Y. (1999). Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α) and HNF1 β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 566-569.
- Peiler,G., Bockmann,B., Nakhei,H., and Ryffel,G.U. (2000). Inhibitor of the tissue-specific transcription factor HNF4, a potential regulator in early *Xenopus* development. *Mol. Cell Biol.* 20, 8676-8683.
- Plengvidhya,N., Antonellis,A., Wogan,L.T., Poleev,A., Borgschulze,M., Warram,J.H., Ryffel,G.U., Krolewski,A.S., and Doria,A. (1999). Hepatocyte nuclear factor 4 gamma: cDNA sequence, gene organization, and mutation screening in early onset autosomal-dominant type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 2099-2102.
- Price,J.A., Fossey,S.C., Sale,M.M., Brewer,C.S., Freedman,B.I., Wuerth,J.P., and Bowden,D.W. (2000). Analysis of the HNF4 α gene in Caucasian type-II diabetic nephropathic patients. *Diabetologia* 43, 364-372.
- Reijnen,M.J., Sladek,F.M., Bertina,R.M., and Reitsma,P.H. (1992). Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6300-6303.
- Rempel,A., Mathupala,S.P., Griffin,C.A., Hawkins,A.L., and Pedersen,P.L. (1996). Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type-II hexokinase. *Cancer Res.* 56, 2468-2471.

- Rosen,E.D., Walkey,C.J., Puigserver,P., and Spiegelman,B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-1307.
- Rupp,R.A., Snider,L., and Weintraub,H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev.* 8, 1311-1323.
- Ryffel,G.U. and Lingott,A. (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1 α promoter in transgenic *Xenopus*. *Mech. Dev.* 90, 65-75.
- Sambrock,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. (2nd edition) Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Sarraf,P., Mueller,E., Smith,W.M., Wright,H.M., Kum,J.B., Aaltonen,L.A., de la,C.A., Spiegelman,B.M., and Eng,C. (1999). Loss of function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. *Mol. Cell* 3, 799-804.
- Sel,S., Ebert,T., Ryffel,G.U., and Drewes,T. (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 α and HNF1 α . *Cancer Lett.* 101, 205-210.
- Shih,D.Q., Dansky,H.M., Fleisher,M., Assmann,G., Fajans,S.S., and Stoffel,M. (2000). Genotype/phenotype relationships in HNF4 α /MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes* 49, 832-837.
- Sladek,F.M., Dallas-Yang,Q., and Nepomuceno,L. (1998). MODY1 mutation Q268X in hepatocyte nuclear factor 4 alpha allows for dimerization in solution but causes abnormal subcellular localization. *Diabetes* 47, 985-990.
- Sladek,F.M. and Seidel,S.D. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha. In: Nuclear receptors and genetic disease, T.P.Burris and E.R.B.McCabe (eds.), Academic Press, pp. 309-348.
- Sladek,F.M., Zhong,W.M., Lai,E., and Darnell,J.E., Jr. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 2353-2365.
- Spaeth,G.F. and Weiss,M.C. (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol. Cell Biol.* 17, 1913-1922.
- Stoffers,D.A., Thomas,M.K., and Habener,J.F. (1997a). Homeodomain protein IDX-1 a master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Trends. Endocrinol. Metab.* 8, 145-151.
- Stoffers,D.A., Ferrer,J., Clarke,W.L., and Habener,J.F. (1997b). Early onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat. Genet.* 17, 138-139.
- Stoffers,D.A., Zinkin,N.T., Stanojevic,V., Clarke,W.L., and Habener,J.F. (1997c). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. Genet.* 15, 106-110.

- Suaud,L., Formstecher,P., and Laine,B. (1999a). The activity of the activation function 2 of the human hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4 α) is differently modulated by F domains from various origins. *Biochem. J.* 340, 161-169.
- Suaud,L., Hemimou,Y., Formstecher,P., and Laine,B. (1999b). Functional study of the E276Q mutant hepatocyte nuclear factor 4 alpha found in type 1 maturity onset diabetes of the young: impaired synergy with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II on the hepatocyte nuclear factor 1 promoter. *Diabetes* 48, 1162-1167.
- Swevers,L. and Iatrou,K. (1998). The orphan receptor BmHNF4 of the silkworm *Bombyx mori*: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains. *Mech. Dev.* 72, 3-13.
- Torchia,J., Glass,C., and Rosenfeld,M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 373-383.
- Tronche,F., Ringeisen,F., Blumenfeld,M., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (1997). Analysis of the distribution of binding sites for a tissue specific transcription factor in the vertebrate genome. *J. Mol. Biol.* 266, 231-245.
- Tronche,F. and Yaniv,M. (1992). HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14, 579-587.
- Umesono,K. and Evans,R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.
- Vaxillaire,M., Abderrahmani,A., Boutin,P., Bailleul,B., Froguel,P., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (1999). Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J. Biol. Chem.* 274, 35639-35646.
- Wang,H., Maechler,P., Antinozzi,P.A., Hagenfeldt,K.A., and Wollheim,C.B. (2000a). HNF4 α regulates the expression of pancreatic beta-cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275, 35953-35959.
- Wang,H., Antinozzi,P.A., Hagenfeldt,K.A., Maechler,P., and Wollheim,C.B. (2000b). Molecular targets of a human HNF1 α mutation responsible for pancreatic beta-cell dysfunction. *EMBO J.* 19, 4257-4264.
- Wang,H., Maechler,P., Hagenfeldt,K.A., and Wollheim,C.B. (1998). Dominant-negative suppression of HNF1 α function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J.* 17, 6701-6713.
- Weber,H., Holewa,B., Jones,E.A., and Ryffel,G.U. (1996). Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4 binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1 α promoter. *Development* 122, 1975-1984.
- Wild,W., Pogge,v.S., Nastos,A., Senkel,S., Lingott-Frieg,A., Bulman,M., Bingham,C., Ellard,S., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 beta inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4695-4700.
- Winter,W.E. and Silverstein,J.H. (2000). Molecular and genetic bases for maturity onset diabetes of youth. *Curr. Opin. Pediatr.* 12, 388-393.

- Yamagata,K., Furuta,H., Oda,N., Kaisaki,P.J., Menzel,S., Cox,N.J., Fajans,S.S., Signorini,S., Stoffel,M., and Bell,G.I. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene in maturity onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384, 458-460.
- Yamaoka,T. and Itakura,M. (1999). Development of pancreatic islets. *Int. J. Mol. Med.* 3, 247-261.
- Yang,Q., Yamagata,K., Yamamoto,K., Cao,Y., Miyagawa,J., Fukamizu,A., Hanafusa,T., and Matsuzawa,Y. (2000). R127W-HNF4 α is a loss of function mutation but not a rare polymorphism and causes Type-II diabetes in a Japanese family with MODY1. *Diabetologia* 43, 520-524.
- Zapp,D., Bartkowski,S., Holewa,B., Zoidl,C., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (1993). Elements and factors involved in tissue specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 6416-6426.
- Zhong,W., Mirkovitch,J., and Darnell,J.E., Jr. (1994). Tissue specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol. Cell Biol.* 14, 7276-7284.

Lebenslauf

Name: Jörn Lausen

Geburtsdatum: 22.11.1971

Geburtsort: Kappeln (Schlei)

Schulausbildung: 1978-1982 Grundschule
1982-1988 Realschule
1988-1991 Fachgymnasium Sozialwirtschaft
„Hannah-Ahrendt Schule“, Flensburg
1991 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 1991-1992 Zivildienst

Studium: 1992-1998 Studium der Biologie an der
Christian-Albrechts Universität (CAU), Kiel
1997-1998 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel:
„Identifizierung und Charakterisierung eines
nematodenresponsiven Promotors und Gens aus
Arabidopsis thaliana“ am Institut für Phytopathologie
der CAU-Kiel.
1998 Abschluß des Studiums der Biologie mit dem Diplom
ab 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut
für Zellbiologie des Uniklinikums Essen in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G.U. Ryffel

Essen den 06.02.2001

Jörn Lausen